

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Farmacología**



**EFFECTO DE METANFETAMINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE  
METALOPROTEINASAS Y SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA  
BARRERA HEMATOENCEFÁLICA EN RATÓN : ESTUDIOS  
DE NEUROTOXICIDAD**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Andrés Urrutia Elorduy**

Bajo la dirección de las doctoras

M<sup>a</sup> Isabel Colado Megía  
M<sup>a</sup> Dolores Gutiérrez López

**Madrid, 2013**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
FARMACOLOGÍA



**EFFECTO DE METANFETAMINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE  
METALOPROTEINASAS Y SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA  
BARRERA HEMATOENCEFÁLICA EN RATÓN. ESTUDIOS DE  
NEUROTOXICIDAD.**

**TESIS DOCTORAL**  
**Andrés Urrutia Elorduy**  
Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
FARMACOLOGÍA



**EFFECTO DE METANFETAMINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE  
METALOPROTEINASAS Y SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA  
BARRERA HEMATOENCEFÁLICA EN RATÓN. ESTUDIOS DE  
NEUROTOXICIDAD.**

**TESIS DOCTORAL**

Directoras:  
Dra. M<sup>a</sup> Isabel Colado Megía  
Dra. M<sup>a</sup> Dolores Gutiérrez-López

**Andrés Urrutia Elorduy**  
Madrid, 2012

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera mostrar mi agradecimiento a tantas personas que, han hecho posible esta Tesis Doctoral:

A mis Directoras de Tesis, la Dra. M<sup>a</sup> Isabel Colado y la Dra M<sup>a</sup> Dolores Gutiérrez-López por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y realizar esta tesis doctoral. Sin sus consejos y críticas constructivas no podría haber llegado hasta aquí. Por estas razones, también quiero agradecer su colaboración a la doctora Esther O'Shea.

A los Directores del Departamento, el Dr. Ignacio Lizasoain y la Dra. M<sup>a</sup> Isabel Colado por permitirme incorporarme y trabajar en el departamento.

A la secretaria del departamento, M<sup>a</sup> Elena por su eficiencia y su bien hacer.

A Fernando, M<sup>a</sup> Luisa y Manolo, por su asistencia técnica durante estos años.

A los diferentes jefes de grupo del departamento, por su ayuda y sus consejos desinteresados.

Al Dr. ElAli y al Dr. Hermann, así como a su grupo de Essen, por su inestimable ayuda.

A mis compañeros de laboratorio, mis compañeros de departamento, y mis amigos, por aguantarme y ayudarme durante estos 4 años, en los momentos buenos y en los no tan buenos.

Por supuesto quiero agradecerles y dedicar esta tesis a mis padres, a María y Jon, a mi familia, y especialmente a Nieves. Sin ellos esto no habría sido posible.

## ABREVIATURAS

**2,3-DHBA**, ácido 2,3-dihidroxibenzoico

**5-HIAA**, ácido 5-hidroxiindolacético

**5-HT**, 5-hidroxitriptamina; serotonina

**ABC**, ATP binding cassette

**ADN**, ácido desoxiribonucleico

**ADP**, adenosín difosfato

**al**, colaboradores

**AMPA**,  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato

**AMPT**,  $\alpha$ -metil-p-tirosina

**ANOVA**, análisis de varianza

**ARN**, ácido ribonucleico

**ATP**, adenosín trifosfato

**APMA**, acetato de aminofenil mercurio

**BHE**, barrera hematoencefálica

**BSA**, seroalbúmina bovina

**CuZnSOD**, superóxido dismutasa cobre-zinc

**DA**, dopamina

**DAT**, transportador de dopamina

**DEH**, dosis equivalente en humano

**DOPAC**, ácido 3,4-dihidroxifenilacético

**E.E.M**, error estándar de la media

**ELA**, esclerosis lateral amiotrófica

**g**, gramos

**GABA**, ácido  $\gamma$ -aminobutírico

**h**, horas

**h.p.l.c.** cromatografía líquida alta resolución

**HVA**, ácido homovanílico

**i.p.**, intraperitoneal

**IgG**, inmunoglobulina G

**IL-6**, interleuquina 6

**ISZ**, zimografía *in situ*

**JNK**, c-jun terminal kinasa

**t-JNK**, c-jun terminal kinasa total

**p-JNK**, c-jun terminal kinasa fosforilada

**kDa**, kilo Dalton

**L**, litros

**L-DOPA**, L-3,4 dihidroxifenilalanina

**LCR**, líquido cefalorraquídeo

**log**, logaritmo

**LPS**, lipopolisacárido

**M**, molaridad

**MAO**, monoamino oxidasa

**MDMA**, 3,4-metilenodioximetanfetamina

**METH**, metanfetamina

**mg**, miligramos

**mg/kg**, miligramos por kilogramo

**min**, minutos

**ml**, mililitros

**mm**, milímetros

**mM**, milimolar

**MMP**, metaloproteinasa de matriz

**n**, número de animales por grupo

**NA**, noradrenalina

**NAc**, núcleo accumbens

**NaF**, Fluoruro Sódico

**NMDA**, N-metil-D-aspartato

**ng**, nanogramos

**NO**, óxido nítrico

**NOS**, óxido nítrico sintasa

**nNOS**, óxido nítrico sintasa neuronal

**n.s.**, no significativo

**OMS**, Organización Mundial de la Salud

**ONOO-**, peroxinitrito

**p**, probabilidad

**PBN**,  $\alpha$ -fenil-N-terbutil nitrona

**PET**, Tomografía de emisión de positrones

**p/v**, peso/ volumen

**ROS**, especies reactivas de oxígeno

**s**, segundo

**s.c.**, subcutaneo

**SERT**, transportador de serotonina

**SIDA**, síndrome de inmunodeficiencia adquirida

**SN**, sustancia negra

**SNC**, sistema nervioso central

**SOD**, superóxido dismutasa

**TDH**, trastorno por déficit de atención con hiperactividad

**TH**, tirosina hidroxilasa

**TIMP**, inhibidor tisular de metaloproteinasa

**TMD**, dominio transmembrana

**TNF $\alpha$** , factor de necrosis tumoral alfa

**TPH**, triptófano hidroxilasa

**u.a**, unidades arbitrarias

**UCM**, Universidad Complutense de Madrid

**UCP-3**, proteína de desacoplamiento 3

**VIH**, virus de inmunodeficiencia humana

**VMAT2**, Transportador vesicular de monoaminas.

**Vmax**, velocidad máxima

**vs.**, versus

**v/v**, volumen/volumen

**ZO**, zonula ocludens

**$\mu$ A**, microamperio

**$\mu$ g**, microgramo

**$\mu$ l**, microlitros

**$\mu$ M**, micromolar

**%**, porcentaje

**[ $^3$ H]**, tritio

**$^{\circ}$ C**, grado centígrado

**$\Omega$** , ohmio

# ÍNDICE

	Página
• INTRODUCCIÓN	1
○ METANFETAMINA	2
1. Aspectos generales	3
2. Química	4
3. Síntesis	5
4. Antecedentes históricos	7
5. Patrón de consumo	8
6. Farmacología y toxicología	10
6.1 Absorción	10
6.2 Distribución	11
6.3 Metabolismo	12
6.4 Eliminación	12
6.5 Tolerancia y dependencia	12
7. Efectos en consumidores	13
7.1 Efectos adversos inmediatos	14
7.2 Efectos adversos a largo plazo	16
8. Neurotoxicidad	16
8.1 Efectos a corto plazo	16
8.1.1 Sistema dopaminérgico	18
8.1.2 Hipertermia	19
8.1.3 Sistema glutamatérgico	20
8.1.4 Formación de radicales libres	20
8.1.5 Efectos en el comportamiento	20
8.2 Efectos a largo plazo	22
9. Mecanismos implicados en la neurotoxicidad	22
9.1 Hipertermia	23
9.2 Dopamina	24
9.3 Estrés oxidativo	24
9.4 Receptores dopaminérgicos	26

9.5	Glutamato y óxido nítrico	27
9.6	ADN	28
9.7	Disfunción mitocondrial	28
9.8	Disfunción de la barrera hematoencefálica	29
10.	Estudios en el consumidor	32
○	<b>BARRERA HEMATOENCEFÁLICA</b>	34
1.	Aspectos generales	35
2.	Barreras del Sistema Nervioso Central	37
3.	Funciones de las Barreras del Sistema Nervioso Central	38
3.1	Regulación de la homeostasia iónica	38
3.2	Regulación de los neurotransmisores y macromoléculas	39
3.3	Protección contra neurotoxinas	40
3.4	Nutrición del cerebro	41
4.	Biología de la BHE	41
4.1	Unidad neurovascular	41
4.2	Estructura molecular de la BHE	43
4.3	Regulación de la permeabilidad de la BHE	45
4.3.1	Ocludina	45
4.3.2	Claudinas	46
4.3.3	ZO-1	47
4.3.4	Estrés oxidativo	47
5.	Metaloproteinasas	50
5.1	Clasificación	50
5.2	Expresión, activación y regulación	51
5.3	Fisiopatología de las MMPs	53
6.	Transporte a través de la BHE	54
6.1	Tipos de transporte	55
6.2	Transportadores ABC	56
6.3	Estructura y mecanismo de acción de los transportadores ABC	57
6.4	Distribución en el cerebro y regulación	58
6.5	Funciones fisiológicas	60



○ RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DE ESTRÉS	62
1. Rutas de señalización de estrés	63
• HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	66
• MATERIAL Y MÉTODOS	58
1. Animales utilizados	69
2. Diseño experimental	69
2.1 Estudio del efecto de metanfetamina sobre la expresión y actividad de MMPs, la integridad de la BHE.	69
Implicación de estos factores en la neurotoxicidad causada por la droga	
2.1.1 Estudio temporal de la activación de las MMPs e integridad de la BHE	69
2.1.2 Estudio de la implicación de JNK1/2 en la activación de MMP-9 y la integridad de la BHE	70
2.1.3 Estudio de la implicación de MMP-9 en la integridad de la BHE	71
2.1.4 Estudio de la implicación de la activación de MMP-9 y JNK1/2 en la neurotoxicidad inducida por metanfetamina	71
2.1.5 Estudio del efecto de la temperatura ambiente sobre la actividad de MMP-9 y expresión de laminina	72
2.1.6 Estudio de los cambios inducido por metanfetamina sobre la presión arterial	72
3. Medición de la temperatura rectal	73
4. Medición de la presión arterial	73
5. Estudios de expresión proteica	74
5.1 Extracción y homogenización de la muestra	74
5.2 DC <sup>TM</sup> Protein Assay	74
5.3 Western blot	74
6. Estudios de actividad metaloproteinasas	76
6.1 Zimografía en gel	76
6.2 Zimografía <i>in situ</i>	77

7. Estudios de extravasación de IgG	77
8. Determinación de los parámetros neuroquímicos en tejido cerebral	78
8.1 Determinación de niveles cerebrales de monoaminas y sus metabolitos.	78
8.1.1 Extracción y homogenización de las muestras	78
8.1.2 Cuantificación de la concentración de monoaminas y metabolitos	78
8.2 Determinación de los lugares de recaptación de DA	79
8.2.1 Extracción y homogenización de las muestras	79
8.2.2 Fijación de [ <sup>3</sup> H]-WIN 35,428	79
9. Análisis estadístico	80
10. Procedencia de compuestos utilizados	81
• RESULTADOS	82
1. Cambios inducidos por metanfetamina en la BHE	83
1.1 Efecto de metanfetamina sobre la actividad y expresión de MMP-9 y MMP-2 en el estriado de ratón	83
1.2 Efecto de metanfetamina sobre la expresión de laminina en estriado de ratón	86
1.3 Efecto de metanfetamina sobre la extravasación de inmunoglobulina G en el estriado de ratón	87
1.4 Efecto de metanfetamina sobre la expresión de JNK1/2 en el estriado de ratón	91
2. Efectos de la inhibición de JNK1/2 sobre los cambios en la BHE inducidos por metanfetamina	92
2.1 Efecto de SP600125 sobre la fosforilación de JNK1/2 inducida por metanfetamina	93
2.2 Efecto de SP600125 sobre la extravasación de IgG al parénquima cerebral	94
2.3 Efecto de SP600125 sobre la activación de MMP-9 inducida por metanfetamina	95
2.4 Efecto de SP600125 sobre la degradación de laminina inducida por metanfetamina	96

2.5 Efecto de SP600125 sobre la hipertermia inducida por metanfetamina	97
3. Efecto del inhibidor de MMPs Batimastat sobre la extravasación de IgG y la degradación de laminina inducida por metanfetamina	98
4. Efecto de metanfetamina sobre la activación de MMP-9 y la expresión de laminina en el estriado de ratones mantenidos a 4 °C	102
5. Implicación de los cambios inducidos por metanfetamina sobre la permeabilidad de la BHE en la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por metanfetamina	104
5.1 Efecto de BB-94 sobre la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por metanfetamina	105
5.2 Efecto de SP600125 sobre la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por metanfetamina	106
6. Efecto de metanfetamina sobre la presión arterial de los ratones	107
• DISCUSIÓN	109
○ Estudio temporal de la activación de las MMPs e integridad de la BHE	110
○ Estudio de la implicación de JNK1/2 en la activación de MMP-9 y la integridad de la BHE	113
○ Estudio de la implicación de MMP-9 en la integridad de la BHE	115
○ Estudio de la implicación de la activación de MMP-9 y JNK1/2 en la neurotoxicidad inducida por metanfetamina	116
○ Estudio de los cambios inducidos por metanfetamina sobre la presión arterial	117
• CONCLUSIONES	119
• BIBLIOGRAFÍA	121

# INTRODUCCIÓN

# **METANFETAMINA**

## 1. Aspectos generales

La metanfetamina es un estimulante con gran poder adictivo perteneciente al grupo de las llamadas drogas de síntesis.

La Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito estima que las anfetaminas (metanfetamina, anfetamina y metcatinona) sigue siendo el grupo de sustancias más consumidas incluso por encima de heroína y cocaína consideradas en conjunto (2008 Global ATS Assessment). El número de consumidores de anfetaminas se ha calculado en 2009 entre 14 y 56 millones de personas, lo cual equivale a una tasa de prevalencia de entre 0.3% a un 1.3% de la población mundial con una edad comprendida entre 15 y 64 años.

El consumo de estas drogas se ha documentado en una gran variedad de ambientes, siendo excepcionalmente alto entre los adultos que acuden a fiestas *rave* o clubs privados. También son muy consumidas entre personas infectadas con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Yamamoto et al., 2010).

El clorhidrato de metanfetamina conocido comúnmente como *meth*, se presenta en forma de polvo blanco, cristalino, inodoro y con sabor amargo que se disuelve fácilmente en agua o alcohol. También se puede presentar como cristales transparentes parecidos al hielo que se pueden inhalar o fumar y que se conocen como “*ice*”, “*crystal*” o “*glass*”.

Actualmente la metanfetamina está incluida en la lista II de sustancias psicotrópicas debido a su alto potencial de abuso, si bien en algunos países (Australia o Estados Unidos) tanto la metanfetamina como la d-anfetamina están aprobadas para el tratamiento de varios trastornos como por ejemplo el trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), la narcolepsia o la obesidad (Hart et al., 2012). En los Estados Unidos la metanfetamina se comercializa bajo la marca registrada *Desoxyn*<sup>®</sup> y está autorizada para el tratamiento del trastorno por deficit de atención, así como para el tratamiento de la obesidad (figura 1).



Figura 1. Metanfetamina en comprimidos como *Desoxyn*® (izquierda) y en forma de cristales (derecha).

## 2. Química

La metanfetamina se define químicamente como (S)-N-metil-1-fenilpropan-2-amina, d-N-metilanfetamina o d-deoxiedrina. Su fórmula empírica es  $C_{10}H_{15}N$  (figura 2) con un peso molecular de 149.24 g/mol, un  $pK_a$  de 9.9 y un  $\log P$  de 2.07 (Schep et al., 2010; Schep et al., 2011).

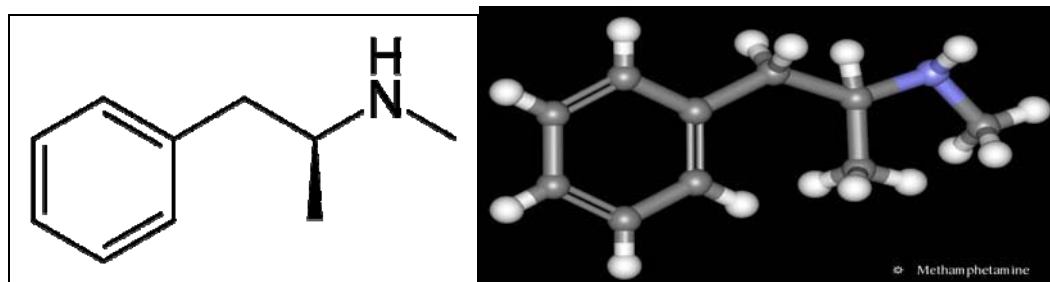


Figura 2. Estructura molecular (izquierda) y tridimensional de la metanfetamina (derecha).

Como podemos observar en la figura 3, la metanfetamina es una base sintética derivada de la feniletilamina y estructuralmente relacionada con la anfetamina. La metanfetamina es una amina secundaria al tener un sustituyente metilo adicional en el grupo amino, y no una amina primaria, razón por la cual no posee propiedades alucinógenas (Wagner and Peroutka, 1990).

Debido a que posee un carbono quiral (carbono  $\alpha$ ) existen dos isómeros ópticos activos, el S-(+)-dextro y el R-(-)-levo-rotatorio, siendo el isómero óptico dextrógiro 5 veces más activo biológicamente que el levógiro.

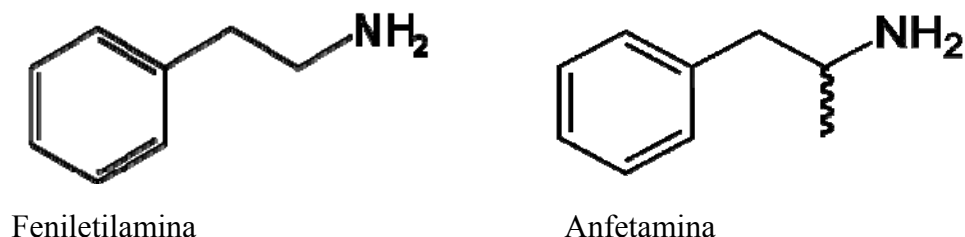


Figura 3. Estructura química de compuestos relacionados con la metanfetamina.

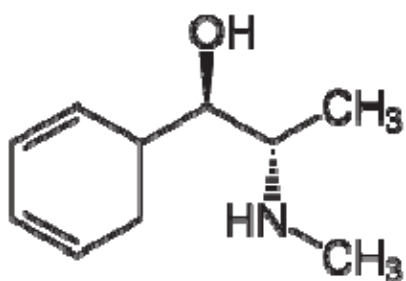
El grupo metilo otorga a la metanfetamina una mayor hidrofobicidad respecto a la anfetamina ( $\log P = 2.07$  vs.  $1.73$  de la anfetamina), aportándole propiedades farmacocinéticas que más tarde se discutirán cuando se aborde el metabolismo y la biodisponibilidad.

### 3. Síntesis

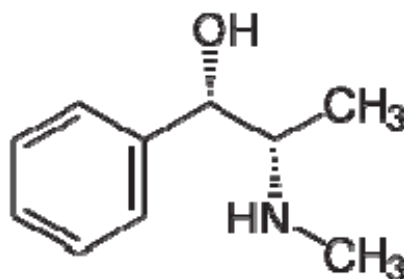
Según el Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (2010), el suministro ilegal de metanfetamina en Europa parte de locales conocidos como “cocinas-laboratorios” y se extiende hasta el tráfico internacional a gran escala. En Europa se centra en dos regiones principalmente: Europa central (especialmente en la República Checa) y el mar Báltico.

La síntesis de metanfetamina es relativamente sencilla. Se realiza con compuestos químicos relativamente baratos como efedrina o pseudoefedrina que se pueden conseguir sin receta médica, de ahí que sea una droga extremadamente abundante en el mercado ilegal (figura 4). Actualmente es muy sencillo obtener manuales básicos en Internet para realizar su síntesis. De hecho con introducir en algún buscador de Internet las palabras Meth y Synthesis se pueden encontrar cientos de “recetas caseras” para la síntesis de metanfetamina (figura 5).





Efedrina



Pseudoefedrina

Figura 4. Precursores en la síntesis de metanfetamina.

No obstante, su síntesis resulta peligrosa ya que se utilizan productos corrosivos e inflamables, sobre todo los solventes que se usan en la extracción y purificación.

Como se observa en la figura 5, las rutas más comunes de síntesis de metanfetamina son a partir del P2P (1-fenil-2-propanona) y de la efedrina o pseudoefedrina.

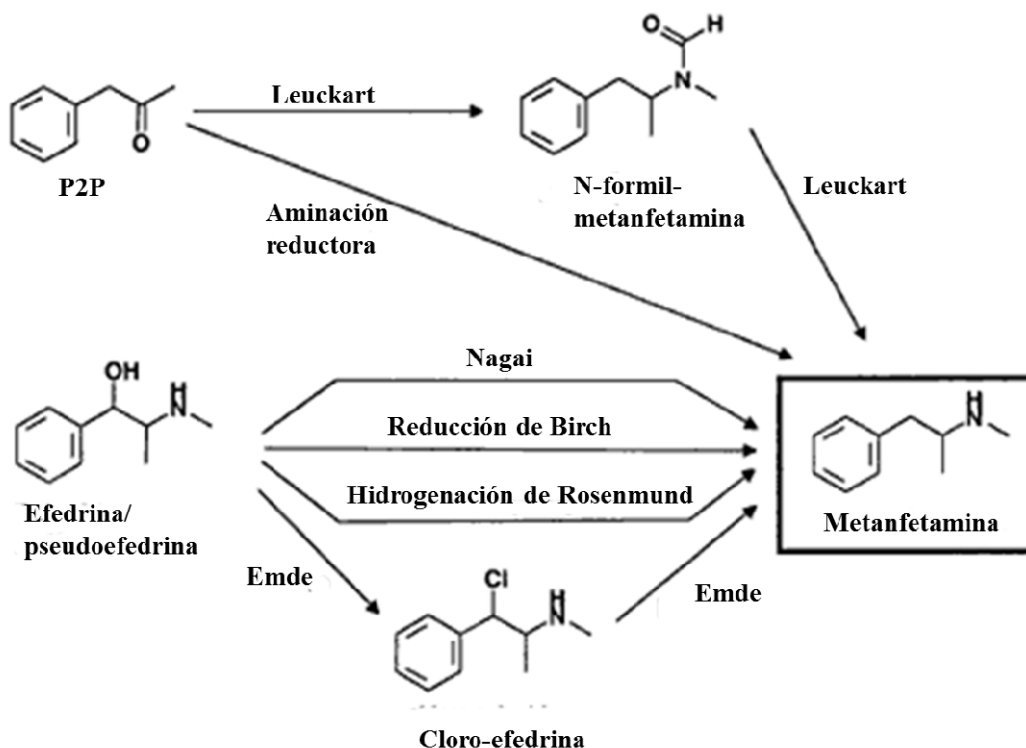


Figura 5. Rutas más comunes de síntesis clandestina de metanfetamina (Modificado de Bulletin of narcotics 1999. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito).

#### 4. Antecedentes Históricos

Las anfetaminas han formado parte de la historia del ser humano desde hace varios siglos. Ya la medicina tradicional china incluía el uso de extractos de efedrina y pseudoefedrina en el tratamiento del asma y de enfermedades bronquiales.

La primera síntesis de anfetamina de la que se tiene constancia data de 1887, cuando el químico rumano Lazar Edeleanu sintetizó en Berlín lo que denominó fenilisopropilamina o anfetamina, pero no fue hasta 1893 cuando Nagai Nagayoshi sintetizó la metanfetamina, siendo en 1919 cuando fue cristalizada por Akira Ogata mediante la reducción de la efedrina.

Las investigaciones iniciales sobre su actividad farmacológica se centraron sobre todo en sus efectos periféricos, descubriéndose que tenía acciones simpaticomiméticas y broncodilatadoras. En 1930 se demostró que incrementaba la presión arterial y en 1932 la farmacéutica Smith and Kline la comercializó como Benzedrina<sup>®</sup> para su uso como broncodilatador. A partir de 1935 se empezó a usar para tratar la narcolepsia por su efecto estimulante, pero no fue hasta el año 1937 cuando la American Medical Association la aprobó para su uso en dicho trastorno. Poco tiempo después aparecería la dexanfetamina bajo el nombre comercial de Dexedrina<sup>®</sup>, y en 1938 se lanzó al mercado la metanfetamina con el nombre comercial de Methedrina<sup>®</sup>.

Durante la Segunda Guerra Mundial los soldados alemanes consumían anfetamina bajo el nombre de Pervitin<sup>®</sup> para eliminar la fatiga y aumentar su estado de alerta, llegando incluso a consumirla mezclada con chocolate. Pero no solo los alemanes consumían esta droga, pues también los soldados americanos y japoneses consumían metanfetamina con el mismo objetivo.

Incluso Adolf Hitler recibía metanfetamina que le inyectaba su médico Theodor Morell por vía intravenosa, cuando se encontraba en condiciones de fatiga o cuando tenía que dirigirse al público en alguno de sus discursos. Se ha sugerido que los síntomas de Parkinson que padecía se debieran al consumo de esta droga (Doyle, 2005).

Entre los años 1940 y 1950, se administraba metanfetamina a los trabajadores de la industria japonesa para aumentar su productividad.

En la década de los 60 el uso de metanfetamina entre la población americana se popularizó y comenzó la fabricación clandestina de la droga para uso personal. De hecho se empezó a consumir para mejorar el rendimiento físico (dopaje deportivo) y el rendimiento intelectual (dopaje cognitivo).

El aumento en el consumo de metanfetamina dividió a los usuarios en dos grupos sociales claramente separados: por un lado se encontraban los consumidores de heroína, que consumían metanfetamina para contrarrestar la somnolencia causada por la heroína, y por otro lado se encontraban los consumidores “puros” de metanfetamina. Estos consumían la droga para conseguir un estado de euforia, excitación y bienestar.

En 1971 en la Convención Internacional de Psicotrópicos en Viena, la metanfetamina se introdujo en la lista II de sustancias controladas, con lo que su circulación se vio drásticamente reducida aunque continuó siendo legal. El hecho de estar en la lista II implica que puede exportarse o importarse, fabricarse, o distribuirse únicamente mediante permisos otorgados por los gobiernos u organizaciones de fiscalización similares. También implica que tiene un alto potencial de abuso.

En los años 80, el hecho de que fuera un producto dispensado indiscriminadamente, que no se conocieran sus peligros potenciales y que no existiera un sistema de farmacovigilancia idóneo, desembocó en un uso recreacional masivo de la droga, que produjo numerosos casos de abuso y de adicción en algunos países.

En la actualidad en España, el Código Penal considera que el consumo de drogas es sancionable por multa, pero que no constituye un delito, así como tampoco es un delito la tenencia de drogas para consumo propio. No obstante, el tráfico de drogas es considerado delito y está penado con cárcel.

## 5. Patrón de consumo

Según consta en el informe publicado por el Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (2010), el consumo de psicoestimulantes y drogas de abuso, durante los fines de semana y especialmente en el ambiente de las fiestas *rave*, macrodiscotecas y festivales, supone un problema de salud pública.

De hecho, ha aparecido una industria clandestina que sintetiza drogas de abuso muy variadas con fines diversos, como pueden ser sedantes, alucinógenos, estimulantes etc., lo cual contribuye a la consolidación de un patrón cultural de uso de drogas conocido por policonsumo.

La metanfetamina es un estimulante del SNC y se presenta en forma de cristal o polvo blanco, inodoro y con un sabor amargo que se disuelve fácilmente en agua (hasta 500 mg/ml) o alcohol (Schep et al., 2010).

La metanfetamina en forma cristalina (“*ice*” o “*crystal*”) aparece como pequeños cristales de diversos tamaños y color blanco azulado. En esta forma tiene un nivel de pureza mayor que cuando se presenta en polvo, de ahí que produzca unos efectos más pronunciados ([www.usdoj.gov/](http://www.usdoj.gov/)).

En cambio, la metanfetamina en forma de clorhidrato es un polvo blanco que puede encontrarse en esta forma, o en forma de comprimidos o cápsulas de 10 a 15 mg. Las formulaciones de metanfetamina contienen entre 5 y 90 mg. Una dosis mayor de 90 mg en un consumidor sin tolerancia a esta droga podría ser letal.

La metanfetamina que se vende en el mercado negro está adulterada. Entre los productos con los que se adultera podemos encontrar cafeína, fenilpropanolamina o fenciclidina (también conocido como polvo de ángel o PCP), leche de magnesio y talco.

Aunque el clorhidrato de metanfetamina se puede esnifar o ingerir, se suele administrar por vía intravenosa y disuelto en agua, como la heroína.

La metanfetamina en forma de cristal se administra por vía inhalatoria de forma similar a como se fuma el crack: los cristales se calientan en papeles de aluminio y se fuman en pipas de cristal.

La administración de esta droga inyectada o fumada produce inmediatamente una intensa sensación conocida como “*rush*” que dura unos minutos y que los consumidores describen como extremadamente placentera, seguida de un estado de euforia que se mantiene hasta 12 h. La administración por vía nasal u oral produce también una sensación de euforia pero menos intensa.

Dado que los efectos placenteros desaparecen antes de que la concentración de la droga en sangre se reduzca significativamente, los usuarios tratan de mantener esa euforia y para ello se administran más dosis cada vez con más frecuencia. Así pues, encontramos que habitualmente las dosis consumidas varían entre 50 y 500 mg (Cruickshank and Dyer, 2009).

Uno de los peligros asociados con el consumo de metanfetamina por vía intravenosa es el mayor riesgo de contagio de virus transmitidos por la sangre como el VIH y la hepatitis B o C.

La visión que se tiene de la metanfetamina por parte de los jóvenes y consumidores es que es una droga inocua. Así, entre el 1 y el 5% de las personas entre 16 y 34 años de edad han consumido metanfetamina (muchos como resultado de su familiarización con otras drogas de síntesis como la MDMA o éxtasis). Después acaban consumiendo otras drogas como la cocaína, con lo que se refuerza el patrón de policonsumo.

El consumo de metanfetamina se ajusta a dos patrones. El primero es un patrón de baja intensidad, que no supone una dependencia psicológica, mientras que el segundo patrón es el denominado

“binge” o “atración”, que se caracteriza por periodos de consumo intensivo mediante la inhalación o la inyección de la droga (The National Clearing House for Alcohol and Drug Abuse, 1997).

## 6. Farmacología y Toxicología

### 6.1 Absorción

Tras su ingestión, la metanfetamina se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal. Los estudios monitorizados con formulaciones terapéuticas indican un  $t_{\max}$  con valores comprendidos entre las 3.13 y las 6.3 h tras la ingestión. Si la administración es intranasal en polvo, la concentración máxima plasmática se alcanza 3 ó 4 h después (Harris et al., 2003; Huestis and Cone, 2007). Cuando lo que se inhala es su vapor, la metanfetamina se detecta rápidamente en sangre, pero su concentración plasmática se incrementa lentamente, alcanzando el máximo a las 2 - 3 h aunque curiosamente, a diferencia del tardío pico plasmático, los sujetos experimentan un efecto subjetivo máximo similar al que se observa a los pocos minutos de la inhalación del vapor (Perez-Reyes et al., 1991).

La biodisponibilidad estimada cuando se ha fumada varía de un 67% a un 90.3% (Cook et al., 1993; Harris et al., 2003) dependiendo de la técnica utilizada y la temperatura de la llama.

Tras su ingestión se estima que el porcentaje de droga no metabolizada es del 64 – 70% mientras (Cook et al., 1992) que, cuando se esnifa es mayor del 79% (Harris et al., 2003).

### 6.2 Distribución

La metanfetamina se distribuye ampliamente en el organismo. Para dosis de 0.25 mg/kg o 0.5 mg/kg, los volúmenes de distribución en humanos son de  $3.73 \pm 0.94$  y  $3.80 \pm 1.05$  l/kg respectivamente (Mendelson et al., 1995). En cuanto a su unión a las proteínas plasmáticas, hay pocos datos respecto a metanfetamina, aunque en el caso de la anfetamina se ha demostrado una unión de aproximadamente un 20% (Franksson and Anggård, 1970).

Debido a su relativamente alta lipofilia y a su bajo peso molecular, la metanfetamina atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica (Rivière et al., 2000), así como también la barrera placentaria y aparece en la leche materna (Bartu et al., 2009; Stewart and Meeker, 1997).

### 6.3 Metabolismo

El metabolismo de la metanfetamina se realiza predominantemente en el hígado, principalmente a través del citocromo P450 2D6 (CYP2D6).

En humanos las rutas metabólicas principales son la hidroxilación aromática, que produce 4-hidroximetanfetamina y la N-desmetilación para formar anfetamina (Lin et al., 1997). Otros metabolitos menores son noradrenalina, 4-hidroxianfetamina, 4-hidroxinoradrenalina, y posiblemente bencil-metil-cetona y ácido benzoico (figura 6).

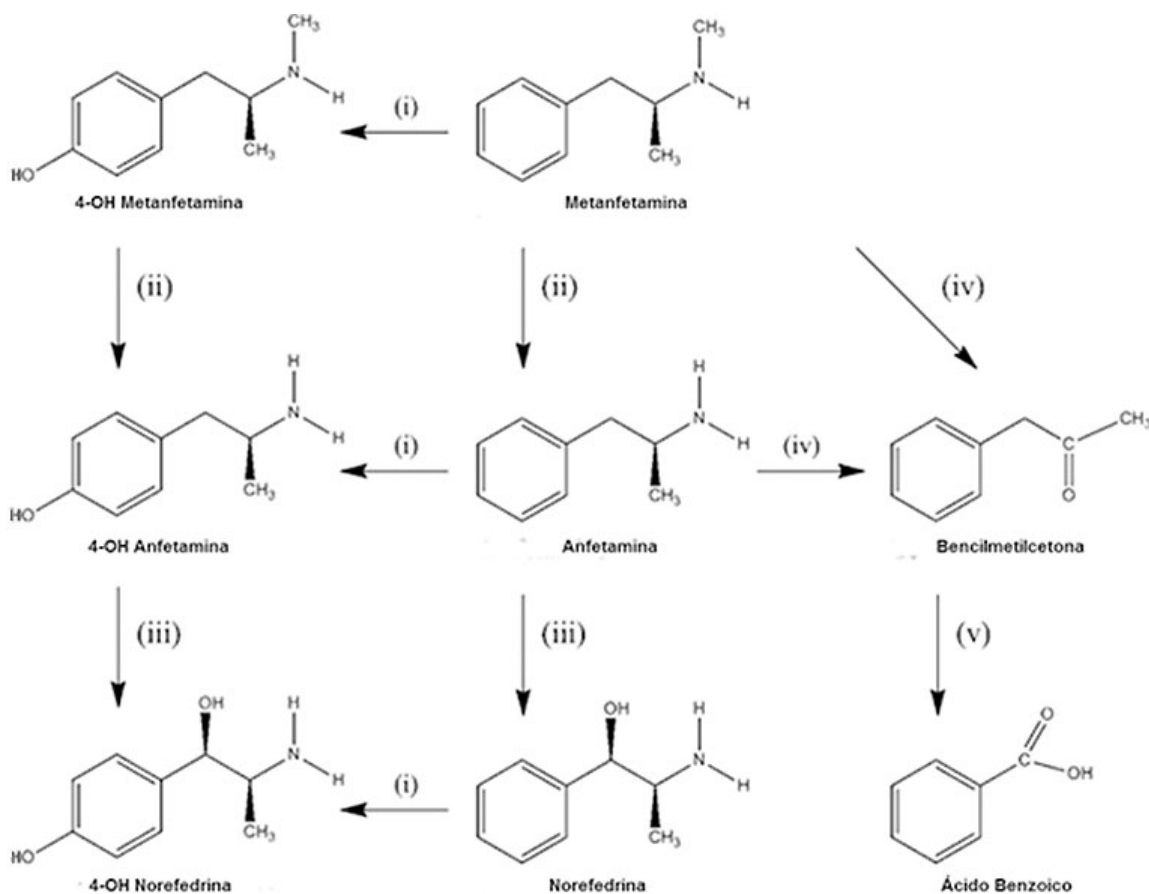


Figura 6. Resumen del metabolismo de la metanfetamina: (i) Hidroxilación aromática, (ii) N-desmetilación, (iii) β hidroxilación, (iv) desaminación oxidativa, (v) alfa-desmetilación. (modificado de Schep et al., 2010).

Las diferencias interindividuales que se observan en el metabolismo de la metanfetamina pueden ser debidas a la variabilidad del CYP2D6. También pueden deberse a diferentes sustancias exógenas que lo modulen o alteren. Por ejemplo, la ingesta de alcohol inhibe el metabolismo de la droga, aunque la ingestión crónica de alcohol puede incrementar la tasa de hidroxilación de la metanfetamina (Shimosato et al., 1988).

#### 6.4 Eliminación

El 90% de la metanfetamina se excreta por vía urinaria (el restante a través del sudor o heces) con una vida-media entre 9 y 12 h. Dado que es una base débil ( $pK_a \approx 9.9$ ) la acidificación de la orina puede incrementar su excreción. Bajo estas condiciones la metanfetamina aparece predominantemente en su estado ionizado, lo que se traduce en una disminución de la reabsorción tubular y un aumento de su eliminación renal (55-70 % de la droga no metabolizada). En cambio, cuando la orina es altamente alcalina el porcentaje de la droga no metabolizada que se excreta es tan solo de un 1 ó 2% (Beckett and Rowland, 1965).

La vía de administración no parece alterar significativamente su vida media de eliminación plasmática (Cook et al., 1993; Harris et al., 2003).

#### 6.5 Tolerancia y dependencia

Tras un consumo elevado se puede producir el fenómeno de tolerancia. Los efectos de la droga disminuyen de manera gradual, por tanto, se requieren dosis cada vez mayores o en mayor número para conseguir el mismo efecto. Una vez el consumo se ha estabilizado, al retirar la droga se produce el síndrome de abstinencia, que incluye fatiga, alteraciones del sueño y un aumento del apetito (Elkashef et al., 2008; Newton et al., 2004).

### 7. Efectos en consumidores

Según las experiencias subjetivas de los consumidores de metanfetamina, los efectos positivos de la droga son: sensación de euforia y bienestar con una mejora en el estado de ánimo, iniciativa y autoconfianza, aumento de la actividad física y energía, disminución de la fatiga y sensación del sueño, además de un aumento de la libido y de la capacidad sexual ([www.nida.nih.gov](http://www.nida.nih.gov)). En los aspectos relacionados con el trabajo, mejora el rendimiento en las tareas mentales sencillas, y aunque permite realizar una mayor cantidad de trabajo, el número de errores es mayor.

Como hemos comentado, hay dos tipos de patrón de consumo; el de baja intensidad y el “*binge*”. Los estadios de este último se resumen en las etapas de: *rush*, *high*, *binge*, *tweaking*, *crash* y *withdrawal*.

*Rush*: también se denomina agitación. Tiene una duración de 5 a 30 minutos y se alcanza si la administración ha sido intravenosa o por inhalación. En este periodo aumenta la frecuencia cardíaca,

la presión sanguínea y el metabolismo. Si la administración es por otras vías los efectos son más suaves.

*High*: también conocido como “subidón”. Dura de 4 a 16 h, el individuo se vuelve locuaz y puede comportarse de manera agresiva.

*Binge*: también conocido como atracón. Este estado se produce cuando al reducirse los efectos placenteros de la droga por el paso del tiempo o la tolerancia, el individuo consume la droga de modo repetido.

*Tweaking*: el individuo no ha dormido en varios días y se encuentra irritable y paranoico.

*Crash*: es el conocido “bajón”, en el cual, el consumidor se vuelve solitario, no se comunica y necesita dormir.

*Withdrawal*: es el llamado Síndrome de Abstinencia. Los consumidores tienen una necesidad inmediata de volver a tomar la droga (recaída) para que los efectos negativos de la droga desaparezcan. El Síndrome de Abstinencia se manifiesta como fatiga, alteraciones del sueño y cambios de humor (Elkashef et al., 2008; Newton et al., 2004).

### **7.1 Efectos adversos inmediatos**

La ingesta de metanfetamina puede producir varios efectos adversos agudos. Entre ellos podemos encontrar: aumento de la presión sanguínea y frecuencia cardiaca, daño irreversible en los vasos sanguíneos del cerebro que puede ocasionar accidentes cerebrovasculares, midriasis, sudoración, sofocos, temblores, logorrea, trismo y bruxismo, tensión muscular, sequedad de boca y nariz, sabor metálico, vómitos, irritación gastrointestinal, diarreas, anhedonia, alteraciones respiratorias, e incluso colapso cardiovascular y en algunos casos, la muerte. También se han descrito taquicardias, taquipnea, convulsiones, trombocitopenia, leucocitosis tardía, congestión pulmonar, infarto de miocardio e infarto cerebral (Schep et al., 2010).

Al igual que sucede con otras drogas de diseño y en los animales de experimentación, uno de los principales síntomas de toxicidad aguda inducida por la metanfetamina es la hipertermia. Este aumento de la temperatura corporal puede producir rabdomiolisis y coagulación intravascular diseminada, que conlleva a la ruptura de vasos sanguíneos, necrosis tisular y fallo renal agudo (Buffum and Shulgin, 2001).

Entre los efectos adversos agudos psiquiátricos podemos encontrar hiperactividad, irritabilidad, insomnio, confusión, conductas estereotipadas, ansiedad, paranoia, ataques de pánico y agresividad (Schep et al., 2010).



## 7.2 Efectos adversos a largo plazo

Debido a las propiedades adictivas de la metanfetamina y a que su consumo produce tolerancia, es frecuente observar un aumento tanto de la dosis como del número y frecuencia de administraciones. La adicción es una enfermedad crónica que cursa con recaídas y que se caracteriza por la búsqueda y el uso compulsivo de la droga. Los enfermos pueden pasar varios días consumiendo droga hasta que se les acaba o están tan confundidos y desorientados (a veces se olvidan de comer e incluso de dormir) que no pueden continuar.

Algunos de los síntomas más comunes asociados al consumo crónico de metanfetamina son el síndrome de unión temporomandibular, erosión dental y dolor miofacial, que son consecuencia del trismo y del bruxismo (McCann et al., 2008). Como se puede observar en la figura 7, se produce también falta de apetito, pérdida de peso, envejecimiento acelerado, sangrado y problemas nasales, heridas que no cicatrizan y la llamada “boca de Meth”, que se caracteriza según la Asociación Dental Americana, por una caries dental incontrolable y dientes ennegrecidos, manchados, podridos, desprendidos o despedazados. Esta “boca de Meth” se asocia a una disminución del flujo salival (que puede provocar xerostomía y facilitar la aparición de placa dental y caries), a los efectos del trismo y bruxismo y a largos periodos de una higiene bucal deficiente.



Figura 7: Aspecto físico de diferentes consumidores de metanfetamina antes y tras el uso de la droga. A la derecha se puede observar una boca típica del consumidor de metanfetamina.

Entre los efectos psiquiátricos adversos a largo plazo podemos encontrar ansiedad, confusión, insomnio, trastornos emocionales, comportamiento violento e irritabilidad.

Cuando el consumo se ha realizado por largos periodos y con altas dosis, se pueden producir psicosis paranoides, que se caracterizan por delirios persecutorios y sentimientos de omnipotencia. También aparecen delirios conocidos como los *Meth mites*, en los que los consumidores sienten que tienen insectos bajo la piel y se rascan hasta destrozarse ([www.nida.nih.gov](http://www.nida.nih.gov)) (figura 8).



Figura 8. Ejemplos de consumidores que han sufrido los *Meth mites*

## 8. Neurotoxicidad

### 8.1 Efectos a corto plazo

#### 8.1.1 Sistema dopaminérgico

La metanfetamina causa una liberación inmediata de monoaminas de los terminales nerviosos, principalmente de dopamina (DA). Las neuronas dopaminérgicas forman parte de 4 importantes vías cerebrales: la vía mesolímbica, la mesocortical, la nigroestriatal y la tuberoinfundibular, las cuales influyen en las respuestas emocionales y de motivación, en el sistema de la recompensa y en el control de la actividad motora (Wise, 2009). En condiciones fisiológicas, las catecolaminas (incluyendo la DA) se sintetizan en los terminales presinápticos y se encuentran tanto en el citoplasma como almacenadas en vesículas presinápticas. En respuesta a los potenciales de acción presinápticos se liberan por exocitosis al espacio sináptico y actúan en los receptores postsinápticos para generar un potencial de acción postsináptico (Seiden et al., 1993). Las monoaminas liberadas actúan también sobre receptores presinápticos y/o se recaptan en los terminales y en las vesículas presinápticas mediante sistemas de transporte específicos (Venton et al., 2003).

La metanfetamina provoca una liberación masiva de estos neurotransmisores monoaminérgicos por varios mecanismos. La metanfetamina entra en los terminales presinápticos por difusión pasiva a través de la membrana lipídica y a través de los transportadores de dopamina, noradrenalina y serotonina. Una vez en el citosol, la metanfetamina entra en las vesículas presinápticas a través del transportador de monoaminas vesicular 2 (VMAT-2) y facilita la salida de las monoaminas al citosol al neutralizar el pH ácido de las vesículas (debido a que la metanfetamina es una base débil con un  $pK_a \approx 9.9$ ), que es esencial para concentrar las monoaminas en las vesículas ya que esta concentración es en contra de gradiente. Se ha calculado que en condiciones normales, la concentración de monoaminas en las vesículas (cercana a molar) es aproximadamente 100.000 veces mayor que en el citosol (aprox. 10  $\mu M$ ) (Krasnova and Cadet, 2009; Sulzer et al., 2005).

La alta concentración de monoaminas en el citosol (inducida por la acción de la metanfetamina) lleva a su liberación a la sinapsis a través de sus respectivos transportadores, mientras que en condiciones fisiológicas las monoaminas serían transportadas desde la sinapsis al citosol (Fischer and Cho, 1979). Las catecolaminas a tan alta concentración en la sinapsis prolongan la actividad neuronal (Schmitz et al., 2001). La metanfetamina, además de invertir la función del transportador de dopamina (DAT), disminuye su expresión en la superficie celular vía fosforilación y posterior internalización del DAT (Cervinski et al., 2005; Saunders et al., 2000), inhibe la actividad

intracelular de las monoamino oxidasas (MAO) (Suzuki et al., 1980) y promueve la expresión intracelular de la tirosina hidroxilasa (TH), lo cual lleva a una mayor síntesis de DA (Larsen et al., 2002; Mandell and Morgan, 1970) y por tanto una mayor actividad neuronal dopaminérgica global (figura 9).

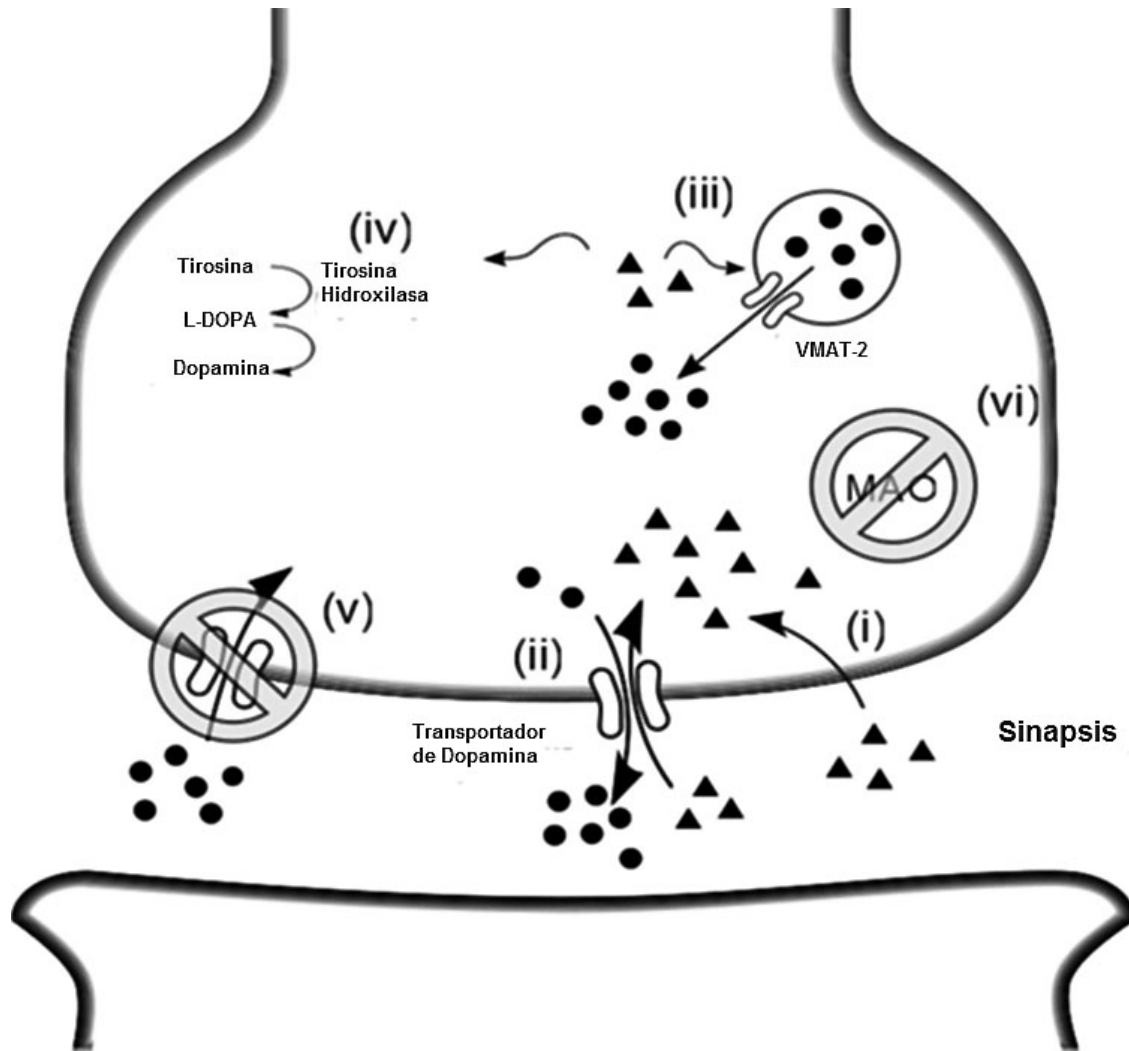


Figura 9. Resumen de los principales efectos a corto plazo de la metanfetamina sobre la transmisión dopaminérgica: la metanfetamina (▲) entra en el terminal dopaminérgico por difusión pasiva (i) o a través del transportador de DA (ii), redistribuyendo la DA (●) de las vesículas presinápticas al citosol neuronal (iii), incrementando la actividad y la expresión de la tirosina hidroxilasa (iv) y promoviendo por tanto el incremento de la concentración de DA en el citosol; lo cual lleva a la liberación masiva de DA a la sinapsis a través del DAT (ii). La metanfetamina también incrementa la actividad neuronal de las monoaminas bloqueando la recaptación presináptica (v), así como inhibiendo las MAO (vi) (modificado de Schepp et al., 2010).

### 8.1.2 Hipertermia

Uno de los efectos más característicos de la administración de metanfetamina a nivel sistémico es el aumento de la temperatura corporal de los animales. Esta respuesta hipertérmica es una de las causas más importantes de muerte por metanfetamina en humanos, además de ser causa de posteriores complicaciones (Davidson et al., 2001).

En el ratón, la administración de metanfetamina a una temperatura ambiente de 20-22 °C produce una respuesta hipertérmica dosis-dependiente de entre 1 y 2°C respecto de la temperatura basal del animal, con un pico de temperatura máxima a los 30-60 minutos después de la administración de la droga.

El mecanismo por el cual la metanfetamina causa una respuesta hipertérmica no está completamente esclarecido. La liberación de DA y la activación de los receptores de DA parecen ser críticos puesto que esta respuesta térmica es atenuada por antagonistas tanto de receptores dopaminérgicos D1 como de D2 (Albers and Sonsalla, 1995; Broening et al., 2005). Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que la administración de un agonista del receptor D1 (SKF38393) puede inducir hipertermia en el ratón, y que este efecto se revierte mediante la administración de SCH23390, que es un antagonista del receptor D1 (Sánchez, 1989; Zarrindast and Tabatabai, 1992).

Otro mecanismo posiblemente implicado en la hipertermia inducida por metanfetamina es la liberación de interleuquina 1 $\beta$  en el hipotálamo (Bowyer et al., 1994), que está considerada como uno de los principales pirógenos endógenos (Leon, 2002). Se ha observado que la administración de metanfetamina incrementa los niveles de RNA mensajero de interleuquina 1 $\beta$  en el hipotálamo del ratón (Halladay et al., 2003; Numachi et al., 2007) y, a su vez, la administración intracerebroventricular de interleuquina 1 $\beta$  produce una respuesta hipertérmica (Dascombe et al., 1989).

La respuesta hipertérmica podría tener también como origen la activación del sistema nervioso simpático y del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal e hipotálamo-hipofisario-tiroideo, por un mecanismo que implicaría la liberación de noradrenalina (NA) por parte de la metanfetamina. La NA activaría por tanto la proteína de desacoplamiento 3 (UCP-3) a través de los receptores  $\alpha_1$  y  $\beta_3$  adrenales, y a su vez produciría la pérdida de la capacidad de disipar el calor debido a una vasoconstricción mediada por el sistema nervioso simpático (Sprague et al., 2004).

La respuesta hipertérmica es dependiente de la temperatura a la que se administra la droga (Ali et al., 1994; Miller and O'Callaghan, 1994). Así, cuando la droga se administra a baja temperatura ambiente (4°C) se observa una respuesta hipotérmica en vez de la hipertérmica que se produce a

temperatura ambiente de 20-22°. Estudios en nuestro laboratorio han demostrado, utilizando otro derivado anfetamínico (MDMA), que cuando se administra la droga a una temperatura ambiental elevada (30°C), la respuesta hipertérmica es más pronunciada que a una temperatura estándar de 20°C (Green et al., 2004; Sanchez et al., 2004).

### 8.1.3 Sistema glutamatérgico

El glutamato, que es el principal aminoácido excitatorio del SNC, juega un papel importante en la adicción a drogas. En general, la disminución de la transmisión glutamatérgica disminuye la recompensa y el efecto de refuerzo de las drogas de abuso (Gass and Olive, 2008). El papel del glutamato en la adicción está relacionado directa o indirectamente con modificaciones en la actividad del sistema dopaminérgico.

Desde los años 80 se sabe que el glutamato está implicado en las propiedades psicoestimulantes de las anfetaminas. Mediante estudios de microdiálisis intracerebral *in vivo* en la corteza cerebral (Shoblock et al., 2003) y el estriado dorsal (Earle and Davies, 1991) se comprobó que las anfetaminas aumentan los niveles extracelulares de glutamato, postulándose este aumento como uno de los posibles efectos causantes de la neurotoxicidad de la droga (Mark et al., 2007; Mark et al., 2004; Nash and Yamamoto, 1992). Tras la administración sistémica de metanfetamina se produce un incremento en la concentración extracelular de glutamato que es máximo a las 6 h después de la primera inyección (Nash and Yamamoto, 1992), sugiriendo por tanto que la neurotoxicidad estriatal dopaminérgica producida por metanfetamina puede estar mediada por el aumento en la liberación de glutamato. El hecho de que el tratamiento con metanfetamina no aumentara la liberación de glutamato en núcleo *accumbens*, región donde se observó que no había daño dopaminérgico, parecía apoyar la hipótesis de la implicación del glutamato en la neurotoxicidad inducida por metanfetamina.

Sin embargo, algunos investigadores han demostrado que la administración local de altas dosis de anfetaminas disminuye los niveles extracelulares de glutamato en ciertas regiones cerebrales (Kalivas and Duffy, 1997; Nash and Yamamoto, 1992).

Por otro lado la administración de dosis únicas de metanfetamina produce un aumento de la fosforilación en el receptor de glutamato AMPA en estriado, lo cual altera la conductancia de este receptor (Snyder et al., 2000). Este efecto podría estar mediando fenómenos de plasticidad.

Además, parece que los efectos estimulantes sobre la locomoción dependen del sistema glutamatérgico, ya que la co-administración del antagonista del receptor NMDA (MK-801) bloquea el incremento en la actividad locomotora inducido por anfetamina (Karler et al., 1989).

#### 8.1.4 Formación de radicales libres

Numerosos estudios han demostrado que la administración de metanfetamina produce, a corto plazo, un aumento en la formación de radicales libres en forma de especies reactivas de oxígeno o nitrógeno tanto en el cerebro de animales de experimentación como en el de consumidores (Fitzmaurice et al., 2006; Imam et al., 2001a).

Una clara indicación de la formación de radicales hidroxilo en el estriado del ratón es el incremento de los niveles del ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHBA) en el dializado estriatal *in vivo* tras una única inyección de metanfetamina (5 mg/kg) (Battaglia et al., 2002).

Además, la administración de antioxidantes como N-acetil-L-cisteína, ácido ascórbico o vitamina E, atenúa la neurotoxicidad inducida por metanfetamina a largo plazo (De Vito and Wagner, 1989; Fukami et al., 2004; Hashimoto et al., 2004; Wagner et al., 1985).

#### 8.1.5 Efectos en el comportamiento

Al igual que ocurre con otras anfetaminas, la metanfetamina provoca un aumento en la actividad locomotora y una disminución en la actividad exploratoria.

Elevadas dosis de anfetaminas en el ratón pueden inducir un comportamiento de autolesión (*self injurius behaviour*) que se ha observado que está asociado a la liberación de DA y la neurotoxicidad dopaminérgica (Kita et al., 2000).

La administración de múltiples inyecciones de metanfetamina, pero no una sola, incrementa la agresividad de los ratones (Sokolov et al., 2004), efecto que no es secundario a la hiperactividad inducida por la droga (Sokolov and Cadet, 2006).

### 8.2 Efectos a largo plazo

Está ampliamente descrito que la metanfetamina en el ratón actúa como una neurotoxina dopaminérgica.

El efecto neurotóxico de metanfetamina en el ratón se caracteriza por una disminución en la actividad de la TH en el estriado (Hanson et al., 2004; Koda and Gibb, 1973; Kogan et al., 1976), que es el enzima limitante en la síntesis de DA, una disminución en la expresión del DAT en el

terminal presináptico (Wagner et al., 1980), que se ha relacionado con una disminución en la densidad de los terminales dopaminérgicos y por tanto, una disminución en el contenido de DA y sus metabolitos DOPAC y HVA en el estriado. Estos efectos se mantienen, por lo menos, 6 meses después de la inyección de la droga (Kita et al., 2003; O'Dell et al., 1991; Schmidt et al., 1985).

Diferentes grupos de investigadores como Sonsalla y colaboradores (Sonsalla et al., 1996), o nuestro laboratorio (Granado et al., 2011b) han demostrado que ratones tratados con metanfetamina sufren una pérdida de las células dopaminérgicas de la sustancia negra de entre un 20% y un 45 % (dependiendo de la dosis administrada). También se encuentran células en degeneración, como lo indica el aumento en la tinción con fluorojade en el estriado del ratón tratado con metanfetamina un día después de la administración de la droga (Granado et al., 2011b).

Así pues, parece que los ratones lesionados con metanfetamina pueden servir de modelo animal para la enfermedad de Parkinson (Sonsalla et al., 1996).



## 9. Mecanismos implicados en la neurotoxicidad

### 9.1 Hipertermia

La respuesta hipertérmica es un modulador del daño que produce la metanfetamina.

La administración de múltiples inyecciones de metanfetamina, a temperatura ambiente estándar produce una severa depleción de DA en el estriado de ratón. En cambio, al administrar la droga a una temperatura ambiente relativamente baja (4-15 °C) se observa una robusta protección frente al daño dopaminérgico, una atenuación en la activación glial (Ali et al., 1994; Miller and O'Callaghan, 1994), así como una disminución en los niveles de los productos provenientes de la oxidación de la DA sin afectar a la liberación de DA (LaVoie and Hastings, 1999).

La hipertermia per se no disminuye los niveles de DA en roedores (Bowyer, 1995). Se cree que el papel que juega la hipertermia modulando el daño neuronal consiste en incrementar las reacciones enzimáticas y no enzimáticas que produce la administración de metanfetamina. La hipertermia incrementa la formación de quinonas de DA (LaVoie and Hastings, 1999) que pueden inactivar la TH (Kuhn et al., 1999), provocar un mal funcionamiento del DAT (Whitehead et al., 2001), inhibir la función de los proteasomas que participan en los mecanismos de detoxificación celular (Zafar et al., 2006) y provocar daño a las neuronas dopaminérgicas (Montine et al., 1997; Spencer et al., 2002).

La inhibición de la hipertermia inducida por metanfetamina disminuye la formación de especies reactivas de oxígeno en el estriado (Fleckenstein et al., 1997), lo cual atenúa el daño a los terminales dopaminérgicos.

Existen compuestos que previenen la neurotoxicidad de metanfetamina únicamente por un efecto sobre la temperatura corporal. Así, la administración de MK-801, un antagonista de los receptores NMDA, reduce la temperatura corporal y es neuroprotector frente al daño inducido por la droga (Ali et al., 1996). Esta neuroprotección desaparece cuando, mediante el uso de mantas homeotérmicas, se consigue que los animales inyectados con MK-801 + metanfetamina tengan una respuesta hipertérmica similar a los inyectados con metanfetamina únicamente.

Por otra parte, el grado de hipertermia correlaciona con la intensidad del daño dopaminérgico siendo los animales que mayor temperatura alcanzan los que mayor daño dopaminérgico manifiestan. Por ejemplo, Miller y Callaghan (Miller and O'Callaghan, 2003) demostraron que administrando a ratones una sola dosis de metanfetamina (20 mg/kg s.c) a una temperatura ambiente de 21 °C se observaba una disminución de DA del 15% frente a los niveles observados en animales tratados con

salino. Cuando el tratamiento se realizó a una temperatura ambiente de 27°C, la disminución observada era del 70%. Esto podría deberse en parte a que la hipertermia incrementa las concentraciones intracelulares de metanfetamina debido a que se potencia la función del DAT (Xie et al., 2000). Se podría pensar, por tanto, que la hipertermia es un factor esencial para el desarrollo de la neurotoxicidad inducida por metanfetamina. Sin embargo los estudios con reserpina, un compuesto que provoca una fuerte disminución en la temperatura corporal de los animales, demuestran que la hipertermia *per se* no es imprescindible para la neurotoxicidad inducida por metanfetamina puesto que su abolición no ofrece protección frente al daño inducido por la droga (Albers and Sonsalla, 1995).

Por otra parte, hay varios compuestos así como manipulaciones genéticas que son neuroprotectoras frente a la neurotoxicidad inducida por metanfetamina y no alteran la hipertermia causada por la droga como pueden ser: inhibidores de nNOS como el AR-R17477AR (Sanchez et al., 2003), inhibidores de la recaptación de DA (Callahan et al., 2001), o ratones *knockout* de IL-6 (Ladenheim et al., 2000).

Parece, por tanto, que la hipertermia contribuye pero no es la única causante de la neurotoxicidad inducida por la metanfetamina.

## 9.2 Dopamina

Numerosos estudios demuestran que la DA por sí misma juega un papel importante en la neurotoxicidad inducida por la metanfetamina (figura 10).

El papel de la DA como mediador del daño inducido por metanfetamina se sustenta también en estudios que han demostrado que este neurotransmisor produce especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo en cultivos que contenían neuronas dopaminérgicas, pero no en cultivos del núcleo *accumbens*, que no contienen neuronas dopaminérgicas (Cubells et al., 1994). Además, el hecho de que la metanfetamina no induzca la formación de especies reactivas de oxígeno en sinaptosomas estriatales carentes de DA, apoya el papel de la DA como mediador en la neurotoxicidad inducida por metanfetamina.

La DA, cuando se libera al citoplasma por acción de la metanfetamina, se auto-oxida rápidamente para formar sustancias potencialmente tóxicas, incluyendo radicales superóxido, radicales hidroxilo, peróxido de hidrógeno y quinonas de DA (Açikgöz et al., 1998; Cubells et al., 1994; Kita et al., 1999; Larsen et al., 2002; LaVoie and Hastings, 1999; Lazzeri et al., 2007; Miyazaki et al., 2006).

Wagner y colaboradores (Wagner et al., 1983) demostraron que al disminuir los niveles citoplasmáticos de DA mediante un inhibidor de la enzima TH, AMPT ( $\alpha$ -metil-p-tirosina) se protege frente a la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por metanfetamina, y que al añadir L-DOPA, que es el precursor inmediato de la DA, se restablecen los niveles normales de DA citoplasmática y desaparece la protección (Gibb and Kogan, 1979; Thomas et al., 2008). El pretratamiento con L-DOPA (que causa un incremento de un 50% en los niveles de DA), exacerba el daño inducido por las posteriores inyecciones de metanfetamina (Thomas et al., 2008). Este aumento en el daño también se observa cuando se administran los inhibidores de MAO clorgilina y pargilina, que también causan un incremento en la concentración de DA citoplasmática (Kita et al., 1995; Thomas et al., 2008).

Yuan y sus colaboradores en 2001 publicaron un estudio en el que demuestran que la DA no juega un papel importante en los efectos neurotóxicos de la metanfetamina (Yuan et al., 2001), ya que observaron que los efectos protectores de AMPT desaparecían cuando se administraba la metanfetamina a animales mantenidos a una temperatura ambiente de 33 grados centígrados, con lo cual se prevenía el efecto hipotérmico del fármaco. Por tanto, postularon que la protección ejercida por AMPT era debida a su propiedades hipotérmicas más que a la disminución de la concentración de DA citoplasmática.

Sin embargo, cuando se administra a los animales reserpina (disminuye el almacén vesicular de DA), se observa un aumento de 5-S-cistenil-dopamina, que es un marcador de la producción de quinonas de DA, y se observa que este marcador aumenta todavía más cuando a estos animales se les administra metanfetamina (Montine et al., 1997; Spencer et al., 2002).

### **9.3 Estrés Oxidativo**

Como hemos visto anteriormente, el estrés oxidativo y la DA están muy relacionados.

Tras la administración de metanfetamina, se produce un aumento intracelular de DA, que puede oxidarse y producir la formación de radicales libres de oxígeno (ROS) e inducir peroxidación lipídica y oxidación de proteínas en terminales nerviosos tanto de rata como de ratón (Lazzeri et al., 2007). Pero además, existen evidencias que implican a estos radicales libres en la neurotoxicidad a largo plazo inducida por la droga.

La Voie y Hastings en 1999 demostraron que la administración de dosis neurotóxicas de metanfetamina en ratas causa la oxidación de DA y forma quinonas de DA que se unen a residuos de cisteína de otras proteínas, formando el complejo protein-cisteinil-DA. Por otro lado, la

metabolización de la DA por la MAO va acompañada de un aumento en la producción de peróxido de hidrogeno, que interacciona con metales como el hierro, cuyos niveles se encuentran aumentados tras la administración de metanfetamina (Melega et al., 2007) y forma radicales hidroxilo tóxicos (Cadet and Brannock, 1998). El hierro parece que juega un papel importante en los efectos neurotóxicos de metanfetamina. La disminución del contenido dopaminérgico que se produce a largo plazo se atenúa con deferoxamina, que es un quelante de hierro (Yamamoto and Zhu, 1998), y es que el hierro cataliza la producción de radicales libres de oxígeno a través de la reacción de Fenton.

Se ha demostrado también que la metanfetamina induce un aumento de los niveles del 2,3-DHBA, que es un marcador de la producción de radicales hidroxilo, en el estriado de la rata 2 h después del tratamiento (Giovanni et al., 1995).

Numerosas evidencias indican que la metanfetamina puede causar estrés oxidativo por un intercambio entre el balance de la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad antioxidante de enzimas capaces de atrapar especies reactivas de oxígeno (Chen et al., 2007; Jayanthi et al., 1998; Li et al., 2008). Por ejemplo, la administración de metanfetamina causa una disminución en los niveles de superoxido dismutasa cobre/zinc (CuZnSOD), catalasa y glutatión en el cerebro, acompañado de un aumento en la peroxidación lipídica (Chen et al., 2007; Jayanthi et al., 1998; Li et al., 2008). En el cerebro de adictos a metanfetamina se ha observado un aumento de productos de peroxidación lipídica como el 4-hidroxinonenal y el malondialdehído frente a cerebros de no consumidores, ambos son marcadores de daño oxidativo en el cerebro (Fitzmaurice et al., 2006). Una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno puede dañar componentes celulares como lípidos, proteínas y el ADN mitocondrial o celular (Potashkin and Meredith, 2006). Estos efectos pueden ser en parte responsables de la degeneración del terminal y apoptosis neuronal inducida por metanfetamina (Krasnova and Cadet, 2009).

Antioxidantes como el ácido ascórbico o vitamina E, disminuyen la neurotoxicidad inducida por la metanfetamina (De Vito and Wagner, 1989; Wagner et al., 1985). Además, atrapadores de radicales libres como el  $\alpha$ -fenil-N-terbutil nitrona (PBN) atenúan el daño neurotóxico que produce metanfetamina, sin alterar la hipertermia (Cappon et al., 1996; Yamamoto and Zhu, 1998). La bromocriptina, un atrapador de radicales hidroxilo, protege frente a la neurotoxicidad inducida por metanfetamina, apoyando también el papel de estos radicales en los efectos neurotóxicos de la droga (Kondo et al., 1994).

Se ha demostrado también que ratones transgénicos que sobre-expresan CuZnSOD son resistentes al daño neuronal inducido por la droga (Cadet et al., 1994; Hirata et al., 1996). Así como los ratones que sobre-expresan enzimas antioxidantes están protegidos frente al daño inducido por la metanfetamina, los ratones *knockout* de NRF2, que es uno de los reguladores principales de la homeostasia redox celular, sufren una gliosis y un daño dopaminérgico axonal en el estriado mayor que los ratones que poseen este factor nuclear (Granado et al., 2011b), demostrando también que el estrés oxidativo juega un papel muy importante en la neurotoxicidad causada por la droga.

#### 9.4 Receptores dopaminérgicos

Varios estudios han demostrado que los receptores dopaminérgicos postsinápticos estriatales están implicados en la neurotoxicidad inducida por metanfetamina.

La administración de sulpirida (antagonista del receptor D2) disminuye los efectos neurotóxicos inducidos por la metanfetamina sobre el sistema dopaminérgico (Sonsalla et al., 1986). Del mismo modo el tratamiento con SCH23390 (antagonista D1) o el tratamiento con eticloprida (antagonista D2), después de la administración de metanfetamina, previenen completamente la disminución en los niveles dopaminérgicos estriatales inducidos por metanfetamina, 7 días después del tratamiento (O'Dell et al., 1993). Una sola inyección de SCH23390, antes de una dosis neurotóxica de metanfetamina, atenúa la disminución en los niveles de DA a largo plazo (Jayanthi et al., 2005).

Animales *knockout* de receptores D1 o D2 han demostrado ser resistentes a la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por la metanfetamina (Ares-Santos et al., 2012; Granado et al., 2011a).

Estos efectos neuroprotectores pueden depender, en parte, de cambios en la liberación de DA, puesto que los antagonistas de receptores dopaminérgicos bloquean parcialmente el aumento en la liberación de DA en el estriado (O'Dell et al., 1993) y también se observan modificaciones de la liberación de DA en los animales *knockout* de receptores D1 o D2 (Ares-Santos et al., 2012; Granado et al., 2011a). Pero tanto los fármacos antagonistas de los receptores D<sub>1</sub>-D<sub>5</sub> como la inactivación genética de receptores D1 y D2, inhiben la respuesta hipertérmica inducida por la droga (Ares-Santos et al., 2012; Broening et al., 2005; Granado et al., 2011a). Cuando se administra metanfetamina a una temperatura ambiente de 29°C a los animales *knockout* de receptores D1, los animales muestran hipertermia y la protección que se obtenía a una temperatura ambiente de 23°C desaparece (Granado et al., 2011a).

Por tanto, parece que la protección se debe a la supresión de la hipertermia inducida por los receptores dopaminérgicos.

### 9.5 Glutamato y óxido nítrico

El papel del glutamato en la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por la metanfetamina es bastante controvertido.

Una liberación excesiva de glutamato está asociada con la muerte neuronal por excitotoxicidad. Este proceso es producido por la activación de receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato, provocando el aumento intracelular de calcio y la consiguiente activación de quinasas, lipasas y proteasas que dañan el citoesqueleto generando radicales libres y dañando el ADN (Sattler et al., 2000).

Varios investigadores observaron que la administración de metanfetamina aumentaba la liberación de glutamato (Abekawa et al., 1994; Nash and Yamamoto, 1992; Stephans and Yamamoto, 1994) y que el bloqueo de los receptores NMDA con el antagonista MK-801 disminuía la neurotoxicidad inducida por metanfetamina (Battaglia et al., 2002; Sonsalla et al., 1989).

La co-administración de dosis no neurotóxicas de metanfetamina junto con dosis no neurotóxicas de NMDA, provoca la aparición de daño neurotóxico causando la disminución de los niveles de DA en el estriado del ratón (Sonsalla et al., 1998). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la DA y el glutamato interaccionan para causar efectos tóxicos en los terminales dopaminérgicos estriatales.

Sin embargo, dado que el MK-801 inhibe la hipertermia inducida por la metanfetamina, estos resultados sugieren que la protección mediada por los antagonistas de receptores glutamatérgicos, depende en parte de la capacidad de este compuesto para inhibir la respuesta hipertérmica inducida por la metanfetamina (Bowyer et al., 1994; Farfel and Seiden, 1995).

El mecanismo por el cual el glutamato influye en la neurotoxicidad inducida por la metanfetamina puede depender, en parte de la producción de radicales superóxido y de óxido nítrico (NO). Dado que la administración de metanfetamina induce un aumento en la liberación de glutamato, se pueden sobre-activar los receptores de NMDA y como consecuencia producir la formación de radicales superóxido y de NO (Gunasekar et al., 1995).

El NO puede reaccionar con radicales superóxido para formar un oxidante más potente, el anión peroxinitrito. La neurotoxicidad inducida por metanfetamina y mediada por NO va acompañada de un aumento en la producción de 3-nitrotirosina en el estriado de ratón, que es un marcador de la producción de peroxinitrito (Pacher et al., 2007).

Cuando se bloquea completamente la formación de 3-nitrotirosina mediante el selenio o la melatonina se previene la neurotoxicidad inducida por metanfetamina (Imam et al., 1999; Itzhak et

al., 1998b). Además se ha observado que los ratones *knockout* de la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS o NOS1) (Itzhak et al., 1998a) y los que sobre-expresan Cu/Zn SOD son resistentes a la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por la droga (Imam et al., 2001b). La administración de inhibidores de la nNOS, como el 7-nitroindazol, protege frente a la neurotoxicidad inducida por metanfetamina, sin alterar la hipertermia (Itzhak and Ali, 1996). Estudios de nuestro laboratorio demostraron que la toxicidad dopaminérgica así como la pérdida de la proteína del neurofilamento NF68 se atenúan mediante el tratamiento con el inhibidor de nNOS, el AR-R17477AR (Sanchez et al., 2003) implicando por tanto a las especies reactivas de nitrógeno en la toxicidad inducida por metanfetamina.

En conjunto, estos estudios demuestran la implicación del óxido nítrico en la neurotoxicidad inducida por metanfetamina.

## 9.6 ADN

Diferentes investigadores han demostrado que la administración de metanfetamina puede causar apoptosis neuronal en diversas regiones cerebrales como estriado, sustancia negra, corteza, hipocampo y bulbo olfatorio (Deng and Cadet, 2000; Deng et al., 2002; Deng et al., 2007; Granado et al., 2011b; Zhu et al., 2006). Tal y como hemos comentado, la administración de metanfetamina está asociada a la producción de especies reactivas de oxígeno y estas puedan causar apoptosis y daño al ADN (Li and Trush, 1993). Por tanto, la hipótesis es que la administración de metanfetamina aumentaría la cantidad de especies reactivas de oxígeno y, por tanto, la oxidación del ADN, lo que conduciría a la apoptosis neuronal. Esta hipótesis está apoyada por datos que demuestran que la metanfetamina causa un incremento en la oxidación del ADN en el estriado, sustancia negra, corteza e hipocampo, al parecer dependiente del incremento en la formación de radicales libres por parte de la prostaglandina H sintasa (Jeng et al., 2006).

## 9.7 Disfunción mitocondrial

La alteración del metabolismo energético puede contribuir a la neurotoxicidad inducida por metanfetamina.

La metanfetamina es una molécula catiónica lipofílica que puede difundir al interior de la mitocondria y ser retenida en este orgánulo (Davidson et al., 2001). La acumulación de moléculas cargadas positivamente provocaría la neutralización del gradiente electroquímico establecido por la

fosforilación oxidativa e inhibiría la síntesis de ATP, causando el fallo energético y la subsiguiente disfunción mitocondrial.

La metanfetamina afecta al equilibrio energético provocando una rápida disminución en la actividad del complejo II (Brown et al., 2005), así como del complejo mitocondrial IV, lo que se ha relacionado con una disminución en los niveles de ATP en el cerebro (Burrows et al., 2000).

Además de la reducción en la generación de ATP, los defectos en la mitocondria son una fuente de especies reactivas de oxígeno (Wu et al., 2007), sugiriendo que la mitocondria afectada por la metanfetamina puede ser una fuente importante de estrés oxidativo para los lípidos y el ADN.

La implicación de la disfunción mitocondrial en el daño inducido por metanfetamina se vio apoyada cuando se demostró que la administración de inhibidores de la cadena de transporte mitocondrial, aumenta el daño inducido por metanfetamina en ratón (Albers et al., 1996), y que los sustratos del metabolismo energético pueden atenuar ese daño neurotóxico (Stephans et al., 1998).

Los efectos de la metanfetamina sobre la mitocondria, ocurren incluso cuando el roedor no tiene hipertermia, sugiriendo que es un proceso independiente de los efectos hipertérmicos de la metanfetamina (Brown et al., 2005).

Otro posible efecto de la metanfetamina sobre la mitocondria se produciría a través del aumento de calcio intracelular que se produce como consecuencia del incremento en la liberación de glutamato, y que puede provocar la inhibición de la cadena de transporte mitocondrial (Kushnareva et al., 2005).

Por tanto, estos estudios sugieren que la disfunción mitocondrial juega un papel importante en la toxicidad inducida por metanfetamina.

### **9.8 Disfunción de la barrera hematoencefálica**

Recientemente se ha descubierto un nuevo mecanismo de toxicidad inducido por la metanfetamina que es la disfunción de la barrera hematoencefálica (BHE).

Varios artículos recientes han examinado el efecto de la metanfetamina sobre la integridad de la BHE y su potencial relación con la toxicidad inducida por la droga (Abdul Muneer et al., 2011; Bowyer and Ali, 2006; Bowyer et al., 2008; Martins et al., 2011; Ramirez et al., 2009). Usando diferentes técnicas de trazado de moléculas (Azul de Evans, NaF, IgG, o albúmina), se ha demostrado que la metanfetamina produce un aumento en la permeabilidad a dichos compuestos. Esta extravasación de los diferentes compuestos se ha podido observar tanto en estructuras con una



alta innervación dopaminérgica como el estriado (Ramirez et al., 2009), como en estructuras donde la innervación dopaminérgica es menor, como el caso del hipocampo (Martins et al., 2011).

Aunque no está claro si hay una relación entre los cambios en la permeabilidad de la BHE y el daño neuronal dopaminérgico, parece que las alteraciones en la BHE contribuyen más a la degeneración del soma de las neuronas estriatales que a la neurotoxicidad en los terminales dopaminérgicos (Bowyer et al., 2008).

Los mecanismos implicados en la ruptura de la barrera no están del todo claro pero todo parece apuntar al estrés oxidativo ya que la administración de un agente antioxidante a los ratones previene el aumento en la extravasación del trazador de pequeño peso molecular, fluoruro sódico (NaF), en el estriado (Ramirez et al., 2009).

Un posible factor mediador en la ruptura de la BHE podría ser la activación de las metaloproteinasas (de las que hablaremos más adelante), cuya función es la de degradar la matriz extracelular, y que son activadas por varios mecanismos incluyendo el estrés oxidativo (Haorah et al., 2007) y la producción de citoquinas (Harkness et al., 2000; Liang et al., 2007; McColl et al., 2008; Wu et al., 2009).

Estos datos en conjunto sugieren que el estrés oxidativo inducido por la metanfetamina podría activar a las metaloproteinasas, lo que causaría la disfunción de la BHE. Las consecuencias de la apertura o ruptura de la BHE son variadas, y es que al alterar la homeostasia del cerebro podrían dañarse numerosas funciones, así como aumentar la entrada de toxinas o infecciones.



## 10. Estudios en el consumidor

Como se ha comentado en apartados anteriores, la administración repetida de metanfetamina causa una disminución en los niveles de tirosina hidroxilasa (TH) que es el enzima limitante de la síntesis de DA, así como una disminución en los niveles de DA y de sus metabolitos (DOPAC y HVA) en diversas especies animales. Este déficit persiste durante semanas y afecta fundamentalmente a la vía dopaminérgica nigroestriatal, causando un daño neuronal parecido cualitativamente al que se observa en la enfermedad de Parkinson (Thrash et al., 2009).

Mediante estudios de neuroimagen por Tomografía por Emisión de Positrones (PET) se ha demostrado que los consumidores de metanfetamina tras un periodo de abstinencia de 3 años muestran alteraciones en el sistema dopaminérgico en los núcleos caudado y el *putamen* (McCann et al., 1998) que podrían estar asociadas con una disminución en la actividad motora y un deterioro en el aprendizaje verbal. Se ha observado también que la densidad del transportador de DA (DAT) está disminuida un 28% en el núcleo caudado y un 21 % en el caudado-putamen de ex-consumidores de metanfetamina tras un periodo de abstinencia mínimo de 11 meses (figura 11)(Volkow et al., 2001).

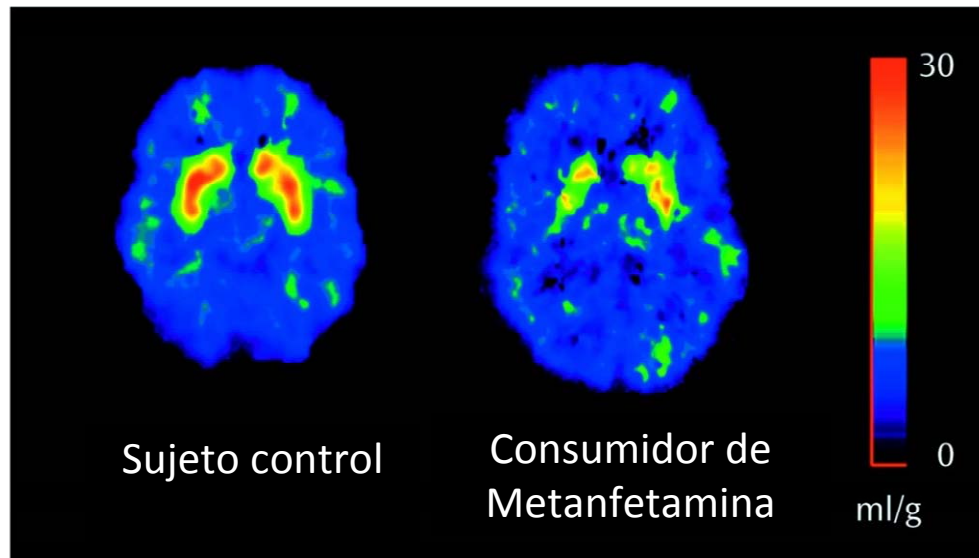


Figura 11: Estudio de PET de la distribución de DAT en el cerebro de consumidores de metanfetamina (Modificado de Volkow et al., 2001).

Cuando se analizaron cerebros postmortem de consumidores de metanfetamina, se observó que en el núcleo *accumbens*, núcleo caudado y *putamen*, los niveles de DA, DAT y TH estaban disminuidos en comparación con los cerebros de no consumidores, aunque no observaron disminuciones del

transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT-2) o de la actividad de DOPA descarboxilasa (Wilson et al., 1996). Estudios posteriores del mismo grupo han cuestionado que el PET de VMAT-2 sea un marcador estable de la integridad *in vivo* de las neuronas dopaminérgicas (Boileau et al., 2008). En otros estudios en tejido postmortem de consumidores de metanfetamina se han encontrado elevados niveles de 4-hidroxinonanal y malondialdehído, que son marcadores de peroxidación lipídica, siendo mayores sus niveles en las zonas del cerebro ricas en DA (Fitzmaurice et al., 2006). También se ha podido comprobar en humanos que al igual que en los animales de experimentación, el consumo de metanfetamina aumenta la activación microglial, en el cerebro de consumidores de metanfetamina en periodo de abstinencia en el estriado, tálamo y mesencéfalo, entre otras estructuras (Sekine et al., 2008).

En el caso del sistema serotoninérgico, estudios de expresión del transportador de serotonina (SERT) en cerebros postmortem de consumidores de metanfetamina concluyen que la metanfetamina podría dañar levemente las células serotoninérgicas o inhibir la expresión del SERT, siendo afectada más la corteza cerebral que las regiones subcorticales (Kish et al., 2009). Sin embargo, sí se ha descrito una clara toxicidad con dexanfetamina en combinación con venlafaxina y citalopram. Dado que la metanfetamina incrementa la liberación presináptica de serotonina e impide su recaptación, existe un riesgo potencial si se utiliza junto con otros agentes serotoninérgicos (Schep et al., 2010).

Puesto que la metanfetamina daña las células dopaminérgicas, el consumo crónico de esta droga podría predisponer a un mayor riesgo de padecer Parkinson, tal y como parecen avalarlo los estudios epidemiológicos (Callaghan et al., 2010; Callaghan et al., 2012).

# **BARRERA HEMATOENCEFÁLICA**

## 1. Aspectos generales

La barrera hematoencefálica (BHE) puede definirse como una propiedad funcional de los vasos sanguíneos del SNC que impide el intercambio libre de iones y moléculas orgánicas entre el plasma sanguíneo y el tejido nervioso. Esta propiedad se basa en la existencia de un endotelio vascular prácticamente impermeable a solutos plasmáticos, de manera que las moléculas orgánicas no puedan atravesarlo libremente.

El cerebro en los humanos, aunque constituye sólo el 2% del peso corporal, recibe un 20% del gasto cardíaco. Si se interrumpe el flujo sanguíneo al cerebro, las funciones cerebrales se interrumpen en cuestión de segundos y el daño a las neuronas se produce en cuestión de minutos (Girouard and Iadecola, 2006). La comunicación neurovascular es crítica para el correcto funcionamiento del cerebro. Se ha estimado que prácticamente cada neurona en el cerebro humano tiene su propio capilar y que la distancia entre un capilar y su neurona no excede de 25  $\mu\text{m}$  (Abbott et al., 2010; Zlokovic, 2005). Se calcula que la longitud total de los capilares del cerebro suma aproximadamente 650 km, y que el área capilar de intercambio de moléculas es de aproximadamente 20  $\text{m}^2$  (Begley and Brightman, 2003). El grosor de la membrana endotelial cerebral está entre 0.2 y 0.3  $\mu\text{m}$ , y este grosor se reduce en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Zlokovic, 2008). Los análisis morfométricos de la vasculatura cortical revelan que los capilares (4-8  $\mu\text{m}$  de diámetro) y las arteriolas y vénulas pequeñas (10-60  $\mu\text{m}$  de diámetro) ocupan entre el 3-4% y 4-6% del volumen cerebral respectivamente, valores que correlacionan bien con algunas medidas de imagen de resonancia magnética del volumen sanguíneo en la sustancia gris en el cerebro humano (Zlokovic, 2008).

El concepto de BHE fue introducido por Paul Ehrlich cuando observó que los tintes solubles en agua teñían todos los órganos del cuerpo con excepción del cerebro y la médula espinal. Su explicación fue que el SNC no tenía, o tenía muy poca afinidad por los tintes solubles en agua. Años más tarde, Edwin E. Goldmann (alumno de Ehrlich) demostró que cuando se administraba un tinte azul directamente en el líquido cefalorraquídeo, se teñía todo el SNC pero no se teñían los órganos periféricos. Estos estudios, junto con los de Lewandowsky y Biedl, en los que observaba que ciertos tóxicos sólo afectaban al cerebro cuando se inyectaban directamente en el mismo, demostraron la existencia de una barrera física que separaba el SNC de la circulación sanguínea. Pero pese a que se conocía la existencia de la BHE, no fue hasta la llegada del microscopio electrónico, cuando fue posible correlacionarla con las células endoteliales capilares del cerebro (Reese and Karnovsky,

1967). Reese y colaboradores observaron que tras la inyección del trazador electrodenso HRP (del inglés *Horseradish Peroxidase* ó peroxidasa de rábano), que es una pequeña proteína de 40 kDa, ésta difundía entre las hendiduras intercelulares del endotelio cerebral hasta llegar a las uniones estrechas entre las células endoteliales. En los vertebrados, por tanto, estas uniones estrechas fueron consideradas como el correlato morfológico de la BHE.

Esta barrera es necesaria debido a que el sistema nervioso central (SNC) es un sistema particularmente vulnerable, ya que es muy sensible a un amplio rango de sustancias químicas, compuestos xenobióticos, fluctuaciones en la composición del plasma y metabolitos en el flujo sanguíneo, que pueden ser dañinos y tóxicos para el SNC (Hawkins and Davis, 2005).

La regulación del microambiente iónico alrededor de las sinapsis y los axones juega un papel crítico, puesto que en el SNC la comunicación neuronal se basa en la combinación de señales eléctricas y químicas (Abbott et al., 2010). Por otra parte, la regulación de aminoácidos, oxígeno y glucosa provenientes de la sangre es crucial para la supervivencia de las neuronas y un correcto funcionamiento del sistema (Hawkins and Davis, 2005).

Como se ha mencionado previamente, la BHE juega un papel fundamental en la homeostasis cerebral. Así pues, su disfunción reviste una gran importancia en el desarrollo y progresión de muchas patologías del SNC. Se ha observado un aumento en la permeabilidad de la BHE en el infarto isquémico o en el trauma cerebral (Ilzecka, 1996; Morganti-Kossmann et al., 2002), lo que conlleva a la aparición de edema cerebral y el agravamiento del daño neuronal. En la esclerosis múltiple, la disfunción de la BHE forma parte directamente de su patofisiología (Minagar and Alexander, 2003) y contribuye al desarrollo de la enfermedad. Cuando se desarrolla un glioblastoma, se produce un incremento en la angiogénesis y en la permeabilidad de la BHE, que aumenta la supervivencia del tumor e implica la formación de edema cerebral (Anderson et al., 2008). También se han observado alteraciones en la BHE en enfermedades como Parkinson, Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o el complejo de demencia asociada al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Zlokovic, 2008). Pero no sólo se observan alteraciones en las enfermedades neurodegenerativas, ya que también se observan disfunciones en la BHE en enfermedades tales como autismo, obesidad, epilepsia o esquizofrenia (Palmer, 2010).

Además de las patofisiologías que comprometen la integridad de la BHE, ésta representa todo un desafío para la industria farmacéutica en el contexto de las farmacoterapias útiles en patologías que afectan al cerebro. En las enfermedades del SNC, la BHE previene la entrada y acumulación del 98% de los fármacos (Pardridge, 2007), puesto que además de su baja permeabilidad, expresa

diferentes transportadores que de una manera activa influyen en los niveles de los fármacos en el cerebro (Hermann et al., 2006; Löscher and Potschka, 2005). Muchos de los fármacos más prometedores no llegan a ser realmente efectivos porque no alcanzan en cerebro una concentración suficiente, y son expulsados del mismo por la BHE. Solamente algunas moléculas lipófilas (con capacidad para formar menos de 8 enlaces por puentes de hidrógeno) y de un peso molecular muy pequeño (menos de 400-500 Da) son capaces de atravesar la BHE (Pardridge, 2007).

Por tanto, para que se puedan abordar farmacoterapias más efectivas es de gran importancia entender tanto la patofisiología de la BHE como los procesos que regulan sus sistemas de transporte.

## 2. Barreras del Sistema Nervioso Central

En el SNC podemos encontrar tres barreras distintas: la barrera hematoencefálica (BHE), la barrera hematoliquoral (BHE-LCR) y la barrera subaracnoidea (figura 12).

Todos los organismos con un SNC bien desarrollado tienen una BHE (Abbott, 2005). En el cerebro y la médula espinal de los mamíferos (incluyendo los humanos), la BHE está formada por las células endoteliales que forman la pared de los capilares. Una segunda barrera la forman las células epiteliales de los plexos coroideos en contacto con el líquido cefalorraquídeo (LCR) formando lo que se conoce como BHE-LCR. El líquido cefalorraquídeo se secreta a través de las células epiteliales de los plexos coroideos al sistema ventricular cerebral (Brown et al., 2004), mientras que el resto del líquido extracelular cerebral (el fluido intersticial) deriva al menos en parte, de la secreción a través del endotelio capilar de la BHE (Abbott, 2004). El LCR y el fluido intersticial se comunican en diferentes localizaciones. Se ha estimado que la contribución del fluido intersticial al LCR es de un 10-60% (Milhorat et al., 1971).

La tercera barrera está formada por el epitelio aracnoideo avascular, que se encuentra bajo la duramadre y rodea completamente el SNC, completando el sellado entre los fluidos extracelulares del SNC y los del resto del cuerpo (Abbott et al., 2006). Aunque este epitelio aracnoideo forma una BHE, su naturaleza avascular así como su área relativamente pequeña indican que no representa una superficie de intercambio entre la sangre y el SNC (Abbott et al., 2010).



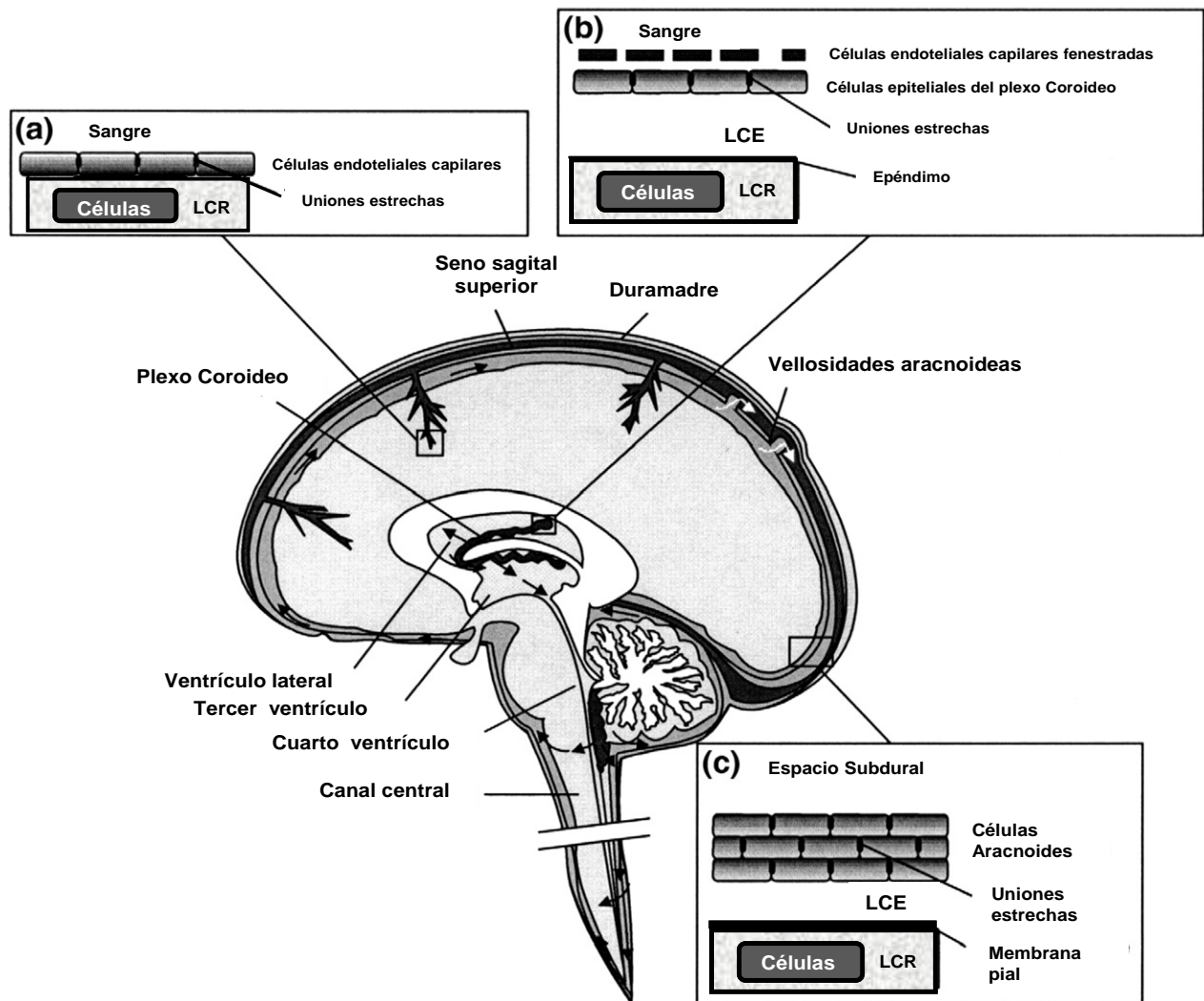


Figura 12. Esquema representativo de las diferentes barreras del SNC (modificado de Abbott et al., 2010).

### 3. Funciones de las Barreras del SNC

#### 3.1 Regulación de la homeostasia iónica

La BHE no sólo permite un ambiente estable para la función neural, sino que además, mediante una combinación de canales iónicos específicos así como de transportadores, mantiene la composición iónica óptima para la función de señalización sináptica.

La concentración aproximada de potasio en el plasma de los mamíferos es de aproximadamente 4.5 mM mientras que en el LCR y en el fluido intersticial cerebral se mantiene aproximadamente en 2.5 – 2.9 mM aunque se produzcan cambios en las concentraciones de potasio plasmático, debidos a la

comida, ejercicio, alteraciones experimentales, o resultantes de alguna patología (Bradbury et al., 1963; Hansen, 1985).

También el calcio, el magnesio y el pH son regulados activamente por la BHE y la barrera hemato-LCR (tabla 2) (Jeong et al., 2006; Nischwitz et al., 2008).

<b>Soluto</b>	<b>Unidades</b>	<b>Plasma</b>	<b>LCR</b>	<b>Ratio</b>
Na <sup>+</sup>	mM	140	141	≈1
K <sup>+</sup>	mM	4,6	2,9	0,63
Ca <sup>++</sup>	mM	5	2,5	0,5
Mg <sup>++</sup>	mM	1,7	2,4	1,4
Cl <sup>-</sup>	mM	101	124	1,23
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	mM	23	21	0,91
Osmolaridad	mOsmol	305,2	298,5	≈1
pH		7,4	7,3	

Tabla 2. Composición iónica del plasma y el LCR (modificado de Begley, 2007).

### 3.2 Regulación de los neurotransmisores y macromoléculas

El plasma sanguíneo contiene altos niveles del aminoácido glutamato, que es el principal neurotransmisor excitador del SNC, y cuyos niveles fluctúan tras la ingestión de comida por ejemplo. Si el glutamato fuera liberado de una forma incontrolada al fluido intersticial cerebral, como en las neuronas en hipoxia tras un infarto isquémico, se produciría un daño neurotóxico, lo cual no ocurre debido a la BHE. Además, y dado que el SNC y sistema nervioso periférico (SNP) comparten varios neurotransmisores, la BHE ayuda a mantenerlos aislados para evitar posibles interferencias entre ellos (Abbott et al., 2006; Bernacki et al., 2008).

La BHE también previene de la entrada de muchas macromoléculas en el cerebro.

El contenido proteico del LCR es mucho menor que el del plasma, y como se puede ver en la tabla 3, la composición individual proteica es marcadamente distinta entre los dos.

Las proteínas plasmáticas como la albúmina, pro-trombina, y plasminógeno, dañan el tejido nervioso, puesto que causan la activación celular, que puede llevar a la apoptosis (Gingrich et al., 2000; Gingrich and Traynelis, 2000; Nadal et al., 1995). El factor Xa (implicado en la conversión de pro-trombina a trombina), el receptor de trombina PAR<sub>1</sub>, y el TPA (convierte el plasminógeno en plasmina) se expresan abundantemente en el cerebro. Esto implica que si aparecen en el fluido

intersticial la pro-trombina y el plasminógeno, son convertidos en trombina y plasmina, y pueden iniciar cascadas de señalización que llevan a activación y división glial, fibrosis, y finalmente la muerte celular (Gingrich and Traynelis, 2000). Por tanto, la entrada de estas moléculas séricas de alto peso molecular al parénquima cerebral a través de una BHE dañada puede tener importantes consecuencias patológicas.

Una de las pocas proteínas que se encuentran en mayor concentración en el LCR que en el plasma es la cistatina-C (tabla 3), que es un inhibidor de serin-proteasas que se sintetiza en el SNC y puede ser una medida protectora frente a micro-roturas en la BHE (Reiber, 2001). Estas micro-roturas ocurren de manera natural y de forma continua y sin la presencia de la cistatina-C permitirían el paso de los componentes plasmáticos al cerebro.

<b>Soluto</b>	<b>Unidades</b>	<b>Plasma</b>	<b>LCR</b>	<b>Ratio</b>
Glucosa	mM	5	3	0,6
Aminoácidos totales	μM	2890	890	0,31
Leucina	μM	109	10,1–14,9	0,10–0,14
Arginina	μM	80	14,2–21,6	0,18–0,27
Glicina	μM	249	4,7–8,5	0,012–0,034
Alanina	μM	330	23,2–32,7	0,07–0,1
Serina	μM	149	23,5–37,8	0,16–0,25
Ácido glutámico	μM	83	1,79–14,7	0,02–0,18
Taurina	μM	78	5,3–6,8	0,07–0,09
Proteína total	mg/ml	70	0,433	0,006
Albúmina	mg/ml	42	0,192	0,005
IgG	mg/ml	9,87	0,012	0,001
Transferrina	mg/ml	2,6	0,014	0,005
Plasminógeno	mg/ml	0,7	0,000025	0,00004
Fibrinógeno	mg/ml	325	0,00275	0,000008
α2-macroglobulina	mg/ml	3	0,0046	0,0015
Cistatina-C	mg/ml	0,001	0,004	4

Tabla 3. Composición proteica del plasma y el LCR (modificado de Begley, 2007).

### 3.3 Protección contra neurotoxinas

La BHE funciona como una barrera que protege el SNC frente a las neurotoxinas que circulan por el torrente sanguíneo. Estas neurotoxinas pueden ser metabolitos, proteínas endógenas, o compuestos xenobióticos. Para evitar la concentración de estos agentes en el cerebro y que, por tanto, puedan dañarlo, se expresan en la BHE unas proteínas conocidas como transportadores ABC (de las siglas en inglés ATP Binding Cassette), que bombean activamente estos tóxicos fuera del cerebro.

### 3.4 Nutrición del cerebro

La BHE tiene una permeabilidad muy baja a muchos de los nutrientes esenciales solubles en agua y metabolitos requeridos por el sistema nervioso. Por ello, se expresan unos sistemas de transporte específicos que aseguran el suministro de estos nutrientes y metabolitos al cerebro (Wolburg 2009), y que están regulados por los astrocitos, que como veremos más adelante están íntimamente asociados a las células endoteliales (Abbott et al., 2006; Wolburg et al., 2009).

## 4. Biología de la BHE

### 4.1 Unidad neurovascular

A nivel anatómico, la BHE está compuesta por células endoteliales cerebrales, astrocitos, pericitos, microglía, neuronas, y matriz extracelular, formando en conjunto lo que se conoce como unidad neurovascular (figura 13). Recientemente, se ha adoptado este concepto como la unidad funcional de la BHE, puesto que se ha demostrado que las interacciones entre las células que la constituyen, así como su comunicación y señalización son cruciales para el correcto funcionamiento de la BHE.

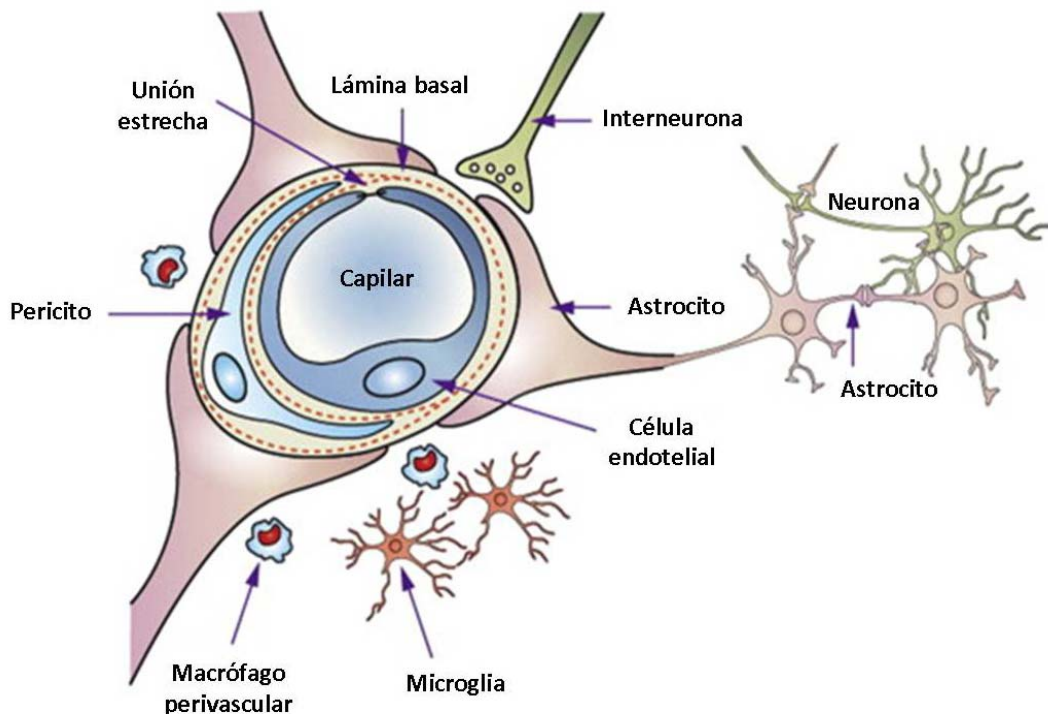


Figura 13. Representación esquemática de la unidad neurovascular (modificado de Abbott et al., 2006).

Las células endoteliales que forman la BHE difieren de otras células endoteliales en que poseen una gran cantidad de mitocondrias (Oldendorf et al., 1977), una tasa muy baja de endocitosis (Ballabh et al., 2004), falta de membranas fenestradas (Fenstermacher et al., 1988) y una baja actividad pinocítica basal (Sedlakova et al., 1999).

Estructuralmente, la unidad neurovascular está formada por células endoteliales que interaccionan con los pericitos que están acoplados al polo basal del endotelio. Además de por los pericitos, las células endoteliales están rodeadas por la lámina basal, compuesta principalmente por laminina, fibronectina, colágeno tipo IV y proteoglicanos de heparán sulfato (Farkas and Luiten, 2001), y que constituye la matriz extracelular que le da un soporte físico a las células endoteliales y pericitos.

Los pericitos del cerebro rodean un 30% de la circunferencia del microvaso cerebral y juegan un papel importante en la regulación de la proliferación, supervivencia y migración endotelial, así como en la modulación de las ramificaciones de los microvasos cerebrales (Hellström et al., 2001).

Además de con los pericitos, la lámina basal interacciona directamente con los pies astrocitarios para cubrir a más del 90% de los microvasos del cerebro. Esta interacción juega un papel crucial en la función de la BHE (Abbott et al., 2006). Los astrocitos también actúan como células de andamiaje guiando a las neuronas durante su desarrollo y a los microvasos recién formados (Jacobs and Doering, 2010; Zhang et al., 1999), y controlan el flujo sanguíneo cerebral (Mulligan and MacVicar, 2004).

Como se ha mencionado, las interacciones entre células juegan un papel crucial a la hora de regular las funciones de la BHE, y de hecho el fenotipo especial de las células endoteliales cerebrales no es suficiente por sí mismo para explicar las características de la BHE. Cuando se cultivan células endoteliales cerebrales aisladas, forman una monocapa permeable que no refleja las propiedades de la BHE *in vivo*.

Los astrocitos secretan moléculas (factores de crecimiento, citoquinas, y neurotransmisores) que actúan directamente no sólo sobre neuronas sino también sobre las células endoteliales y otros componentes de la unidad neurovascular. Cuando se añaden al cultivo astrocitos y/o pericitos, e incluso medio condicionado por astrocitos, la monocapa presenta una mayor resistencia eléctrica e integridad y una menor permeabilidad (demostrando que los astrocitos secretan factores solubles que influyen en el fenotipo de las células endoteliales), reflejando al menos parcialmente las propiedades de la BHE *in vivo* (Lee et al., 2003; Neuhaus et al., 1991). Por tanto, parece que la inducción y el mantenimiento de varias de las propiedades de la BHE, incluyendo la expresión de las uniones estrechas, o la polarización de los transportadores de las membranas endoteliales luminal

y abluminal dependen de la asociación entre los astrocitos y las células endoteliales (Abbott, 2002; Rubin et al., 1991; Wolburg et al., 2009).

Los pericitos también son importantes en la formación e integridad de la BHE. Proporcionan estabilidad mecánica a las células endoteliales depositando matriz extracelular y liberando y activando moléculas que promueven la diferenciación o la quiescencia de las células endoteliales (Armulik et al., 2005). No obstante, los mecanismos moleculares por los que los pericitos promueven la estabilidad de los vasos no están esclarecidos (Zlokovic, 2008). Los pericitos liberan además una gran cantidad de moléculas que regulan la permeabilidad vascular, el remodelado y la angiogénesis (Dore-Duffy and LaManna, 2007), así como el flujo sanguíneo de los capilares a través de su contracción y relajación (Peppiatt et al., 2006).

El papel de la microglía perivascular parece ser dual. Estas células de origen monocítico presentan antígenos y secretan señales que guían la trans migración de los leucocitos desde la sangre al cerebro (Man et al., 2007). En patologías neuroinflamatorias (encefalitis causada por el VIH, esclerosis múltiple o enfermedad de Alzheimer por ejemplo) se produce la apertura de la BHE y la rotura de las uniones estrechas (Avison et al., 2004; Persidsky et al., 2006). Bajo estas condiciones, los fagocitos mononucleares provenientes de la sangre y la microglía secretan citoquinas, quimioquinas, especies reactivas de oxígeno y metaloproteinasas, que pueden alterar la expresión y función de las uniones estrechas (Persidsky and Gendelman, 2003). Por tanto, parece que la microglía amplifica la señal inflamatoria llevando a la disfunción de la BHE mediante el reclutamiento de leucocitos (Persidsky et al., 2006) o por alteraciones en las células endoteliales cerebrales (Stamatovic et al., 2005). Sin embargo, la microglia perivascular podría tener un papel protector. Se ha observado que se produce un descenso de la permeabilidad paracelular de las células endoteliales al realizar cultivos mixtos con microglía perivascular (Zenker et al., 2003). También se ha observado en un modelo de enfermedad de Alzheimer, que los ratones deficientes en la quimioquina microglial Ccr2 (que media la acumulación de fagocitos mononucleares en los sitios de inflamación) sufren un agravamiento en la enfermedad (El Khoury et al., 2007). Así pues la microglia se comporta de manera dual y depende de las condiciones ambientales si su función es protectora o deletérea.

#### **4.2 Estructura molecular de la BHE**

Como se ha mencionado anteriormente, la BHE es una barrera selectiva constituida por células endoteliales especializadas que forman capas que interaccionan dinámicamente con pericitos, astrocitos y neuronas (figura 14).

Comparado con otros sistemas vasculares periféricos, la BHE presenta características especiales como contactos entre células endoteliales muy próximos, que le confiere una resistencia eléctrica transendotelial muy alta ( $\approx 1800 \Omega \text{ cm}^2$ ) (Bazzoni and Dejana, 2004; Zlokovic, 2008) y limitan el paso de la sangre al cerebro y la acumulación de prácticamente todas las moléculas excepto algunas pequeñas y lipófilas (Pardridge, 2007).

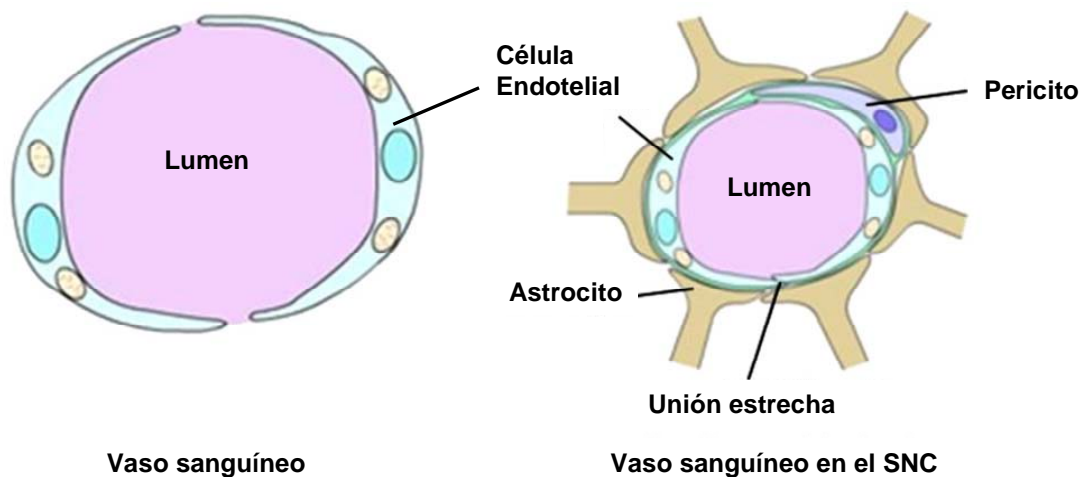


Figura 14. Comparación entre un vaso sanguíneo no cerebral y otro del SNC (modificado de Palmer, 2010).

Los contactos entre células endoteliales están constituidos por complejos de unión especializados. Estos complejos se conocen como uniones estrechas y uniones adherentes (figura 15).

Las uniones estrechas están formadas por las proteínas transmembrana ocludina, claudina (isoformas 3 y 5) y por las JAM (del inglés *junctional adhesión molecules*). Las uniones estrechas son extremadamente sensibles a factores tanto circulantes en sangre como localmente producidos por el SNC, y de esta manera pueden rápidamente modular las propiedades y las funciones de la ruta paracelular (Wolburg et al., 2003). La función de barrera de la BHE no sólo depende de la expresión de estas proteínas sino también del modo en que éstas se organizan e interaccionan entre sí (Hamm et al., 2004).

Para establecer los contactos entre las células endoteliales, estas proteínas interaccionan estrechamente con las proteínas citoplasmáticas accesorias zonula ocludens (ZO-1, ZO-2, ZO-3) (Del Maschio et al., 1999; González-Mariscal et al., 2000; Hawkins and Davis, 2005), cingulina, afadina (AF6), ó 7H6 (Citi et al., 1988; Zhong et al., 1993), entre otras.

Las uniones adherentes están constituidas por las proteínas de membrana caderinas. Las caderinas principales son la VE, P, y N caderina-, que son glicoproteínas con un sólo dominio transmembrana que interaccionan con las proteínas citoplasmáticas cateninas (catenina- $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, y p120 catenina) para establecer los contactos entre células (Schulze and Firth, 1993; Takeichi, 1995).

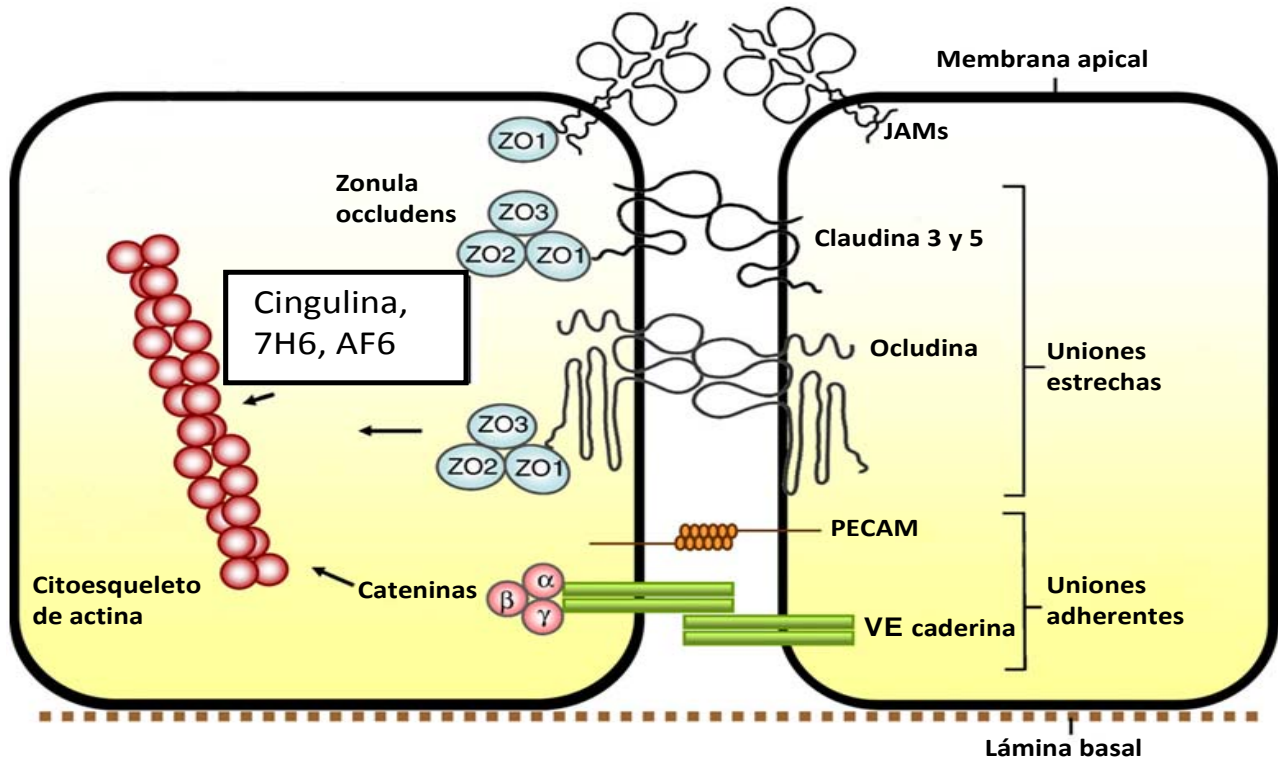


Figura 15. Contactos entre células endoteliales (modificado de Abbott et al., 2010).

### 4.3 Regulación de la permeabilidad de la BHE

La baja permeabilidad paracelular de la BHE se mantiene principalmente gracias a las uniones estrechas (Bazzoni and Dejana, 2004), que están reguladas por varios procesos, entre los cuales destaca la fosforilación de las proteínas ocludina y claudina (Hirase et al., 2001; McCarthy et al., 1996). Estas fosforilaciones (en residuos serina, treonina, y tirosina) influyen directamente sobre la integridad de la BHE, ya que modulan el ensamblaje, disociación y localización celular de dichas proteínas (Andreeva et al., 2001; Rao et al., 2002; Sakakibara et al., 1997).

#### 4.3.1 Ocludina

La ocludina fue la primera proteína integral de membrana de las uniones estrechas de la BHE descubierta. Su importancia en la estabilidad de la BHE se ha observado en estudios *in vitro*



(Bamforth et al., 1999) e *in vivo* (Saitou et al., 2000). Los estudios *in vitro* demostraron que cuando se expresaba una ocludina carente del extremo amino-terminal y los dominios extracelulares, la monocapa de células creaba una barrera incompleta, con una baja resistencia eléctrica transcelular y un alto flujo paracelular a trazadores (Bamforth et al., 1999). Los animales *knock out* para ocludina tienen un fenotipo complejo (alteraciones en la función reproductora y retraso mental entre otras características). Sorprendentemente, estos animales tienen una resistencia eléctrica transepitelial normal y una arquitectura de uniones estrechas bien definida, probablemente debida a compensaciones de otras proteínas de unión como claudina-3, ZO-1, ZO-2, VE-caderina o  $\alpha$ -catenina (Saitou et al., 2000). Pero posiblemente la ocludina tiene otras funciones fisiológicas importantes además de la formación de la BHE, como demuestra el hecho de que los animales *knock out* para ocludina sufren hiperplasia del epitelio gástrico, calcificaciones en el cerebro y atrofia testicular (Saitou et al., 2000).

Los cambios en la expresión o en la fosforilación de la ocludina se han observado en varios modelos en los que se daña la BHE. Por ejemplo, en un modelo de esclerosis múltiple, la desfosforilación de ocludina precede a los cambios visibles en la BHE (Morgan et al., 2007). Tras la isquemia cerebral, la ocludina se fosforila en residuos tirosina y se desfosforila en residuos treonina, rompiéndose su asociación con ZO-1 e incrementando la permeabilidad de la BHE (Elali and Hermann, 2012; Takenaga et al., 2009). La ocludina también es vulnerable tras la isquemia cerebral al ataque de las metaloproteinasas (Rosenberg and Yang, 2007), las cuales pueden degradar además proteínas de la matriz extracelular como laminina o colágeno tipo IV, con lo que contribuyen a la rotura de la BHE (Cheng et al., 2006). En un modelo de encefalitis por VIH, el tratamiento con la proteína Tat disminuye la expresión de ocludina y ZO-1, lo que contribuye a la rotura de la BHE permitiendo la entrada del virus VIH-1 en el cerebro (Pu et al., 2007).

#### 4.3.2 Claudinas

Las claudinas son una familia de más de 20 proteínas que forman uniones estrechas a través de uniones homofílicas (Piontek et al., 2008). En la BHE se expresan la 12, la 5 y la 3 (Wolburg et al., 2009) y cada una regula la difusión de un tamaño determinado de molécula. Por ejemplo, los ratones que carecen de claudina-5 mueren en la fase neonatal debido a que la BHE se vuelve permeable a moléculas menores de 800 Da (Nitta et al., 2003).

La claudina-5 es degradada por MMP 9 y 2 tras la inducción de isquemia cerebral (Yang et al., 2007), y al igual que ocurre con la ocludina, la exposición de células endoteliales cerebrales *in vitro*

a la proteína Tat disminuye la expresión de esta proteína y altera su distribución, lo que puede contribuir a la rotura de la BHE y la posterior entrada del virus VIH (András et al., 2005).

#### 4.3.3 ZO-1

ZO-1 es una proteína citoplasmática de la familia MAGUK (del inglés *membrane-associated guanylate kinase*), de la que también forman parte ZO-2 y ZO-3 (Hawkins and Davis, 2005). Estas proteínas de anclaje entre el citoesqueleto y las uniones estrechas transmembrana, controlan la correcta distribución espacial de las claudinas a través de sus dominios de unión PDZ (Zlokovic, 2008).

En varios modelos en los que se observa la rotura de la BHE, la función o la expresión de ZO-1 están alteradas. En diferentes modelos de esclerosis múltiple, se han observado anomalías en las uniones estrechas que están relacionadas con disminuciones en la expresión de ZO-1 (Kirk et al., 2003). En un modelo de diabetes experimental en rata, hay una relación temporal entre el aumento en la permeabilidad a  $^{14}\text{C}$ -sacarosa y la disminución en la expresión de ZO-1 y ocludina en la BHE. Esto se ha relacionado con un incremento en la actividad de las MMPs plasmáticas (Hawkins et al., 2007), lo que sugiere que además de las MMPs cerebrales, las MMPs plasmáticas también podrían ser responsables de la rotura de la BHE.

Las vías de señalización de estrés JNK1/2 o p38 comprometen la integridad de la BHE alterando la expresión o la fosforilación de las proteínas de las uniones estrechas como ocludina o ZO-1, y por tanto, modulando negativamente la interacción y el ensamblaje entre estas proteínas, lo que da lugar a una disminución en los contactos entre las células endoteliales, lo cual, aumenta la permeabilidad de la BHE (Elali and Hermann, 2012; Schulz et al., 2008).

#### 4.3.4 Estrés oxidativo

Un gran número de estudios han demostrado que el estrés oxidativo se produce en las primeras etapas de los procesos neurodegenerativos (Halliwell, 1999), pero sin embargo todavía existe la pregunta de si es la causa o simplemente una consecuencia de estas enfermedades. Esto se debe a que la BHE puede ser una fuente importante de estrés oxidativo en el cerebro, aunque pequeños incrementos en radicales libres de oxígeno pueden ser suficientes para generarle un daño que podría iniciar diversas patologías cerebrales (Freeman and Keller, 2012).

Las células endoteliales que forman la BHE y el cerebro tienen varios factores inherentes que les convierten en potenciales dianas para sufrir procesos de estrés oxidativo.

El cerebro consume un 20% del oxígeno basal del cuerpo (Shulman et al., 2004). Las neuronas utilizan una gran cantidad de ATP, lo que requiere un nivel de actividad muy alto por parte de las mitocondrias y, por tanto, un alto consumo de oxígeno (Halliwell, 1999). Con tal presencia de oxígeno aumentan las posibilidades de producir especies reactivas de oxígeno. Además, el cerebro y las células endoteliales contienen óxido nítrico, necesario para la neurotransmisión y para la vasodilatación respectivamente (Dawson and Snyder, 1994; Merrill and Murphy, 1997). Este hecho aumenta las posibilidades de que se formen especies reactivas de nitrógeno como el peroxinitrito. La membrana neuronal está formada por una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, que son susceptibles a la peroxidación lipídica y pueden formar productos citotóxicos como el 4-hidroxinonenal, el cual se ha observado en enfermedades neurodegenerativas (Markesbery and Lovell, 1998; Zarkovic, 2003).

Además, las células endoteliales poseen una gran cantidad de mitocondrias, lo que aumenta la probabilidad de generar estrés oxidativo (Grammas et al., 2011).

Entre los posibles mecanismos por los que el estrés oxidativo provocaría la disfunción de la BHE encontramos la activación de las MMPs (figura 16). Los radicales libres activarían las MMPs que estimularían su capacidad de degradar la matriz extracelular alrededor de vasos y neuronas. Esto conllevaría una disminución en el anclaje de las células endoteliales y alteraría las vías de señalización entre la matriz extracelular y las células endoteliales, lo cual afectaría a la integridad de las uniones estrechas y provocaría la rotura de la BHE (Cardoso et al., 2010; Cheng et al., 2006; Rosenberg and Yang, 2007; Zlokovic, 2008).

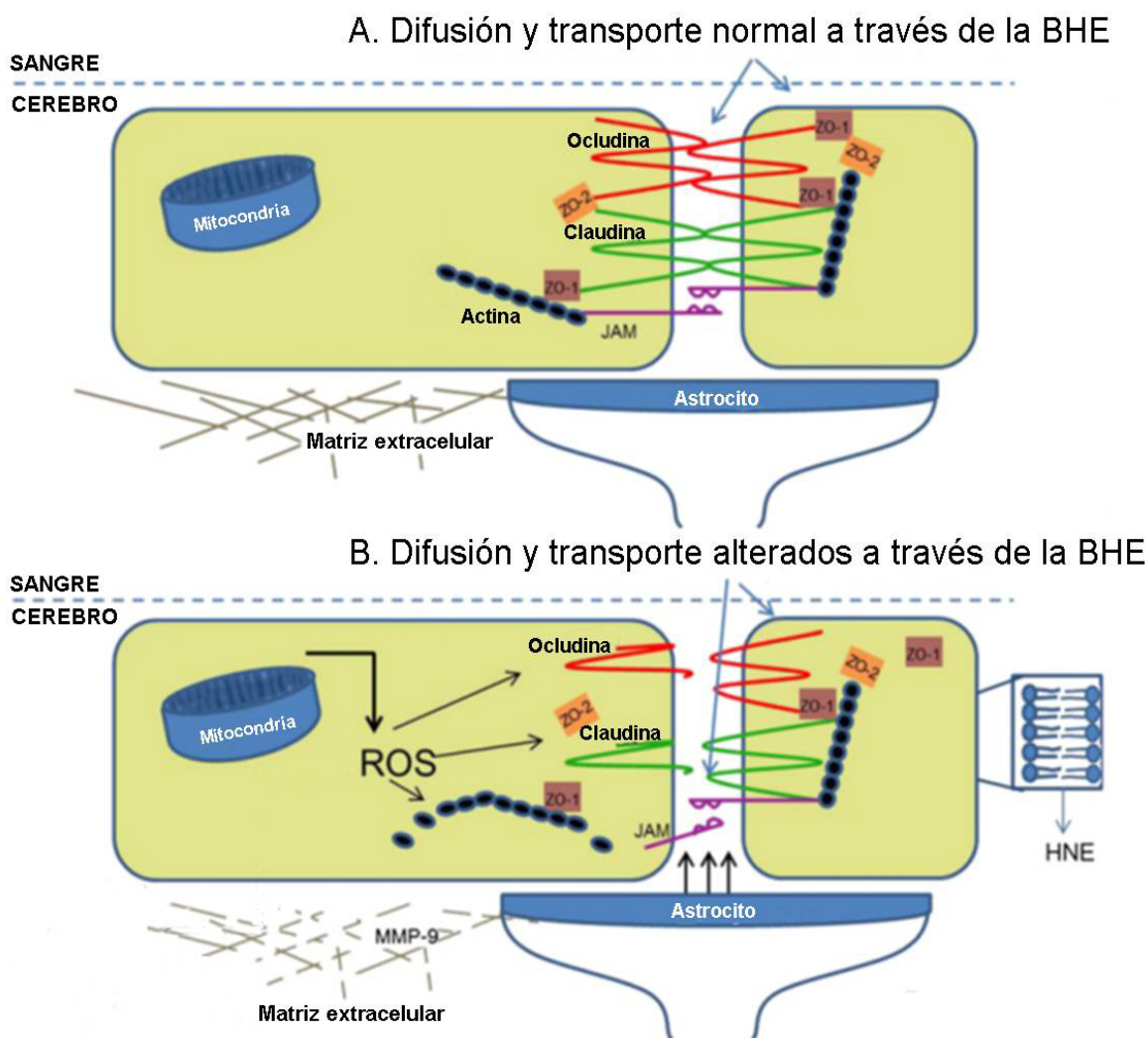


Figura 16. Esquema del efecto del estrés oxidativo en la disfunción de la BHE. En condiciones patológicas, las especies reactivas de oxígeno generadas por varias fuentes (mitocondrias, astrocitos o la bicapa lipídica) se acumulan, causando el desensamblaje de las uniones estrechas, la pérdida de anclaje al citoesqueleto, la degradación de la matriz extracelular por parte de las MMPs y la subsecuente pérdida de la integridad de la BHE. (Modificado de Freeman and Keller, 2012).

## 5. Metaloproteinasas

Las metaloproteinasas son una familia de endopeptidasas que incluyen las metaloproteinasas de matriz (MMPs del inglés *Matrix Metalloproteinases*) y las metaloproteinasas con un dominio disintegrina y metaloproteinasa (ADAM del inglés *A Disintegrin And Metalloproteinase*) (Cauwe et al., 2007).

Las MMPs se producen en forma latente como zimógenos, y una vez activas regulan gran cantidad de procesos fisiológicos y patológicos. Entre estos procesos, las MMPs incrementan la permeabilidad de la BHE atacando la matriz extracelular, la lámina basal, y las uniones estrechas de las células endoteliales (Rosenberg, 2009).

### 5.1 Clasificación

Las MMPs se dividen en 4 grandes grupos dependiendo de su estructura: collagenasas, gelatinasas, estromelisininas, y MT-MMPs (Membrane Type-MMPs).

Las MMPs comparten una estructura común que comprende 4 dominios principales: propéptido, catalítico, del tipo hemopexina, y transmembrana (Rosenberg, 2009) (figura 17).

Las collagenasas degradan el colágeno fibrilar de triple hélice, que es el componente principal del hueso y el cartílago.

Las gelatinasas que más se han investigado son la A (MMP-2) y la B (MMP-9). En el cerebro, la MMP-2 y la 9 son muy estudiadas debido a que están involucradas tanto en la generación de un daño como en los mecanismos de reparación del cerebro. Las gelatinasas degradan moléculas de la matriz extracelular y la lámina basal alrededor de los capilares de la BHE, facilitan la angiogénesis y la neurogénesis y contribuyen a la aparición de muerte celular.

Las estromelisininas (MMP-3, 10, 11, y 7 ó matrilisina) son pequeñas proteasas que degradan componentes de la matriz extracelular (colágeno tipo IV y fibronectina) aunque no fibrillas de colágeno de triple hélice.

Las MT-MMPs son proteasas unidas a membrana activadas intracelularmente por la proconvertasa furina y por la serin-proteasa plasmina. Las MT-MMPs actúan en la superficie celular activando otras proteasas y factores de transcripción.

La gran mayoría de las MMPs (a excepción de las de membrana) son secretadas y actúan en el espacio extracelular. Recientemente se ha encontrado una función intracelular para la MMP-3 ó

estromelina-1 relacionándola con la muerte celular de las neuronas dopaminérgicas (Kim et al., 2005).

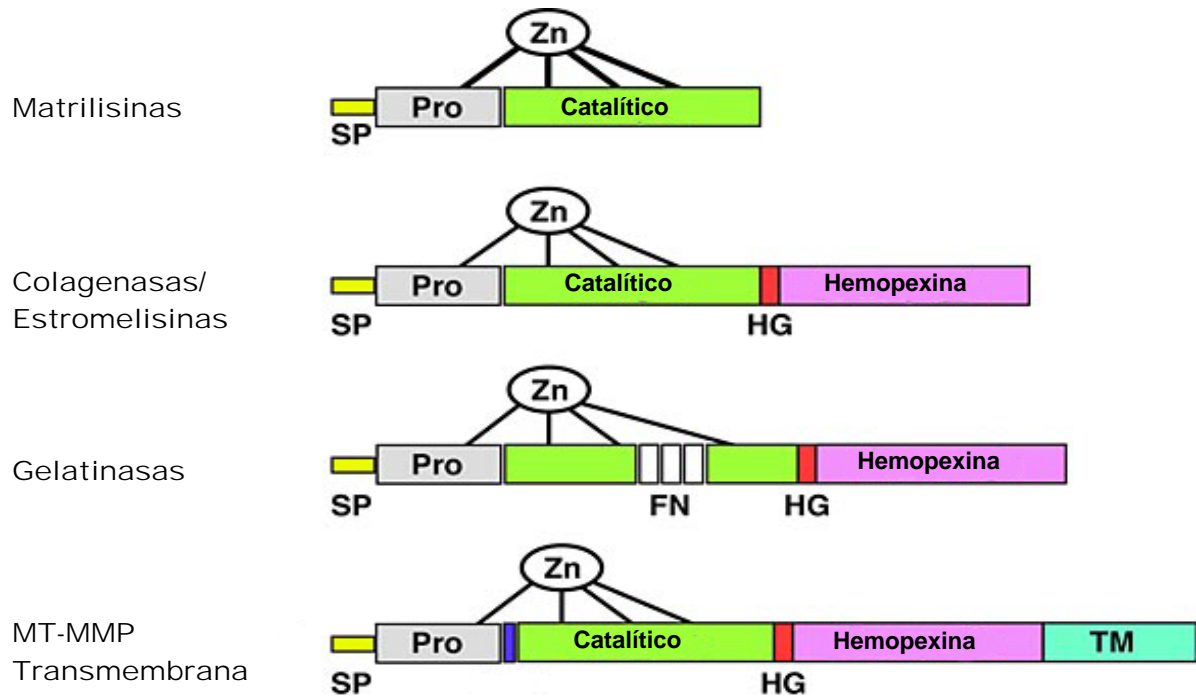


Figura 17. Esquema representativo de la estructura de las MMPs según su tipo (modificado de Brauer, 2006). Sp, péptido señal; HG, dominio de visagra (del inglés *Hinge domain*); TM, dominio transmembrana.

## 5.2 Expresión, activación y regulación

La actividad de las MMPs está regulada a múltiples niveles. El control de su expresión, la activación de la forma proactiva, y la inhibición de las MMPs por los TIMP, que son sus inhibidores naturales, son los procesos de regulación más importantes.

La MMP-2 se expresa constitutivamente en el cerebro y en el fluido cerebroespinal y en la región promotora del gen que la codifica tiene sitios de unión para los factores de transcripción AP2, SP1 y PEA3 (figura 18) (Rosenberg, 2009).

En cambio, la expresión basal de MMP-9 es muy baja pero en respuesta a diferentes estímulos aumenta muy rápidamente. Las regiones promotoras de los genes inducibles que modulan la expresión de MMP-9 contienen sitios de unión para factores de transcripción como AP-1 o NF- $\kappa$ B (figura 18), que responden a oncogenes y citoquinas. Las citoquinas como el TNF $\alpha$  o la

interleuquina 1 $\beta$  inducen la transcripción de la MMP-9, lo que puede ser importante tanto en la neuroinflamación aguda como en la crónica. Respecto a su activación, se han propuesto varios mecanismos, como el procesamiento por otras proteasas (MMP-3) y radicales libres como el óxido nítrico (Gu et al., 2002; Nagase, 1997).

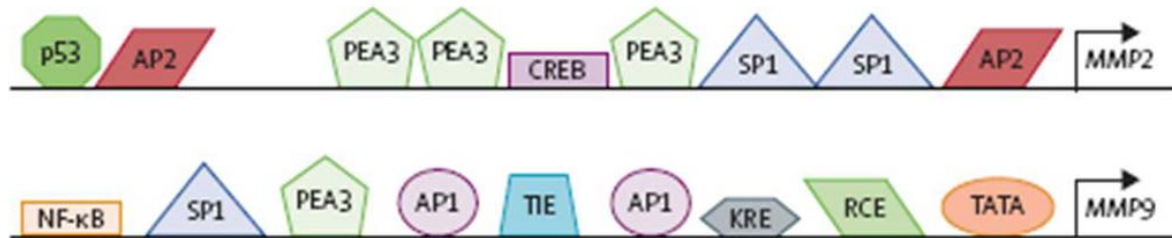


Figura 18. Sitios de unión de los factores de transcripción en las regiones promotoras de MMP-2 y MMP-9 (modificado de Rosenberg, 2009).

Las MMPs son secretadas por todas las células que forman la unidad neurovascular, incluyendo pericitos, astrocitos y células endoteliales. Los astrocitos liberarían la pro-MMP9, que se activaría por acción de la MMP-3, liberada por los pericitos (Rosenberg, 2009). Además, las células endoteliales podrían ser otra fuente de MMP-9, bajo el control de los pericitos (Zozulya et al., 2008).

Otro de los sistemas de regulación de estos enzimas es el control sobre su actividad a través de la eliminación de la forma proactiva en que son secretadas (figura 19).

En el dominio propéptido de las MMPs, hay un residuo cisteína (Cys<sup>73</sup>) que funciona como un estabilizador del enzima proactivo. En el dominio catalítico hay un sitio activo con zinc. La unión de la cisteína al dominio catalítico bloquea el sitio activo del enzima, manteniéndolo en su estado latente (Van Wart and Birkedal-Hansen, 1990). La proteína, por tanto, aunque expresada constitutivamente, continúa en este estado hasta que es activada por radicales libres o por otros enzimas que liberan el residuo cisteína o que degradan la región propéptido. Entonces, una molécula de agua se une al zinc en lugar del residuo cisteína. El estado de zinc no catalítico cambia a un estado de zinc catalítico, convirtiendo a la proteína en un enzima semiactivo. Además, la región propéptido es eliminada bien por procesos autolíticos o por otras proteasas, lo que causa una reducción del peso molecular (generalmente entre 8-10 kDa) y la activación completa del enzima (figura 19). *In vivo*, la activación de las MMPs generalmente la realizan otras proteasas, mientras

que *in vitro* generalmente se activan a través de pH ácido, calor, o productos químicos como el acetato de aminofenil mercurio (APMA) (Springman et al., 1990; Visse and Nagase, 2003).

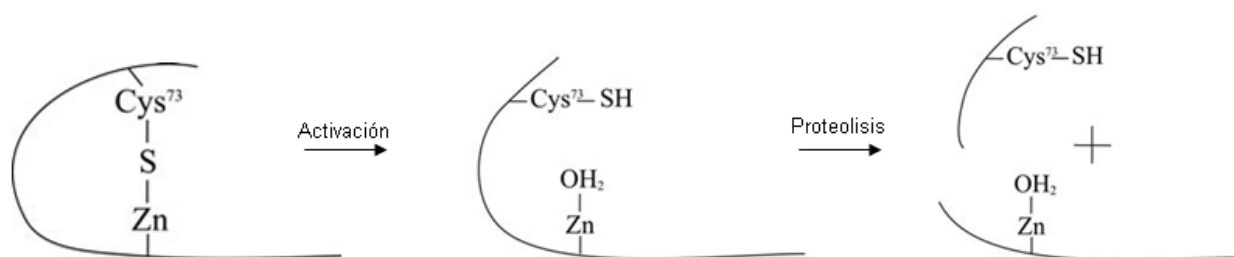


Figura 19. Representación esquemática de la activación de las MMPs (modificado de Snoek-van Beurden, 2005).

Además de su expresión y activación, otra manera de regular la actividad de las MMPs es mediante los TIMP, que son pequeñas proteínas con un peso molecular de entre 21 y 28 kDa codificadas por genes muy conservados evolutivamente (Rosenberg, 2009). Se han identificado 4 TIMPs, siendo nombrados del 1 al 4. Los TIMPs inhiben prácticamente todas las MMPs, pero tienen más afinidad por unas que por otras. TIMP-1 inhibe principalmente la MMP-9 mientras que TIMP-2 inhibe principalmente la MMP-2 (y paradójicamente contribuye a su activación). TIMP-3 inhibe varias moléculas unidas a membrana como MMP-14 o MMP-3 (Cunningham et al., 2005). Por último, el TIMP-4 inhibe a todas de forma inespecífica (Rosenberg, 2009).

### 5.3 Fisiopatología de las MMPs

En los últimos años se ha puesto de manifiesto que la regulación de las MMPs es uno de los procesos principales tanto en el desarrollo normal como en las patologías cerebrales (Wolburg et al., 2009).

De forma fisiológica, las MMPs tienen un papel importante en el desarrollo embrionario y en la morfogénesis tisular (Stamenkovic, 2003), en la angiogénesis (Vu et al., 1998), inflamación (Parks et al., 2004), cicatrización (Kyriakides and Bornstein, 2003), plasticidad neuronal, y aprendizaje (Wright and Harding, 2009).

Pero las MMPs también tienen un papel destacado en varias condiciones patológicas cerebrales como la hipoxia/isquemia, enfermedad de Parkinson, Alzheimer, o enfermedades autoinmunes (Rosenberg, 2009).



En isquemia/hipoxia se produce una activación de la MMP-9 que incrementa la permeabilidad de la BHE y el tamaño del infarto a través de la reorganización o la degradación de las uniones estrechas. Estos efectos son revertidos mediante la inactivación genética o farmacológica de MMP-9 (Asahi et al., 2001; Bauer et al., 2010). El mecanismo por el cual la MMP-9 aumenta la permeabilidad de la BHE no está del todo esclarecido. Al degradar moléculas de la matriz extracelular como laminina o colágeno tipo IV, se perturbaría la integridad de la BHE produciéndose una reorganización de las uniones estrechas y por tanto un aumento de la permeabilidad, aunque la MMP-9 podría interaccionar directamente con las uniones estrechas para degradarlas y así producir la disfunción de la BHE (Bauer et al., 2010).

En modelos experimentales de esclerosis múltiple, las regiones desmielinizadas se asocian con la inflamación alrededor de los vasos sanguíneos del cerebro y la médula espinal. El tratamiento de los animales con un inhibidor no selectivo de MMPs suprime el desarrollo de la enfermedad (Gijbels et al., 1994).

En la enfermedad de Alzheimer, uno de los factores principales es la acumulación de las placas de  $\beta$ -amiloide. La MMP-9 participa en el catabolismo de los péptidos de  $\beta$ -amiloide (Yin et al., 2006). Por tanto, niveles disminuidos de MMP-9 podrían llevar a una acumulación de los péptidos de  $\beta$ -amiloide y a la formación de placas que como hemos apuntado antes, parece ser uno de los factores principales en el desarrollo de esta enfermedad.

En otra enfermedad neurodegenerativa como es la enfermedad de Parkinson, se ha implicado a la MMP-3 en la muerte neuronal dopaminérgica. *In vitro* las neuronas dopaminérgicas apoptóticas liberan MMP-3, que activan la microglía, que a su vez liberaría  $\text{TNF}\alpha$ , llevando a las células a la muerte. Además, la MMP-3 actuaría intracelularmente en rutas de señalización de apoptosis ligada a la caspasa 3 (Choi et al., 2008; Kim et al., 2005).

## 6. Transporte a través de la BHE

Como ya hemos comentado, la BHE constituye una barrera física y selectiva entre el SNC y la sangre. La presencia de las uniones estrechas es responsable de la gran resistencia eléctrica de la barrera. Esta resistencia tan alta restringe el paso de un gran número de moléculas y compuestos a través de la BHE. El cerebro tiene una demanda metabólica altísima puesto que consume un 20% del oxígeno del cuerpo y aproximadamente un 25% de la glucosa. Por tanto es crucial un buen

sistema de intercambio entre la sangre y el cerebro, y para ello la BHE está dotada de un sistema específico de transportadores como los transportadores ABC (del inglés *ATP Binding Cassette*) o los SLC (del inglés *solute carrier*). Los transportadores ABC actúan principalmente como transportadores de bombeo, usando energía para expulsar moléculas tóxicas y limitar su entrada al cerebro. Los transportadores SLC en cambio captan moléculas que son necesarias para el correcto funcionamiento del cerebro como glucosa o aminoácidos. Los transportadores ABC representan un desafío en la farmacoterapia de las enfermedades del SNC puesto que restringen la entrada y la acumulación de los fármacos en el cerebro (Hermann and Bassetti, 2007).

### **6.1 Tipos de transporte**

El paso a través de la BHE puede realizarse por varias rutas, como la difusión pasiva, los transportadores ABC, los transportadores SLC, la transcitosis, y la migración de las células mononucleares (figura 20).

Por difusión pasiva atraviesan la BHE las moléculas lipídicas o apolares, y de pequeño tamaño (< 450 Da). Las bases atraviesan mejor la BHE debido posiblemente a que interaccionan con la superficie cargada negativamente del glicocáliz o los fosfolípidos de la cara luminal.

Los transportadores ABC expulsan de manera activa algunas de las moléculas que han podido atravesar la BHE por difusión pasiva así como moléculas tóxicas producidas por el cerebro. Los transportadores SLC transportan de manera activa o pasiva moléculas polares esenciales para el cerebro como glucosa, aminoácidos ó nucleósidos entre otros.

La transcitosis puede ser mediada por receptor o por adsorción. En el primer caso se requiere que el ligando se una a un receptor y pueden transportarse moléculas como péptidos y proteínas. En la transcitosis por adsorción se produce el transporte no específico de macromoléculas cargadas positivamente. Los dos procesos parecen estar basados en sistemas de transporte vesicular.

Por último, los leucocitos atraviesan la BHE por un sistema de diapédesis a través de las células endoteliales o mediante la modificación de las uniones estrechas, que abren total o parcialmente la BHE permitiendo el paso de las células.

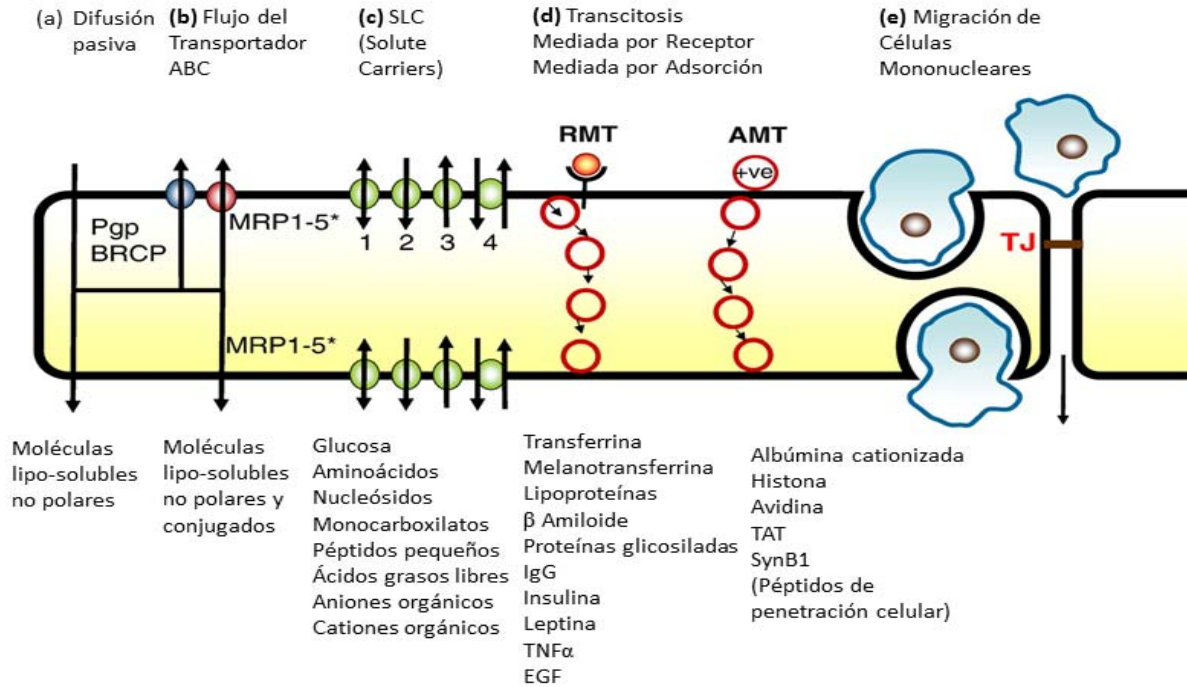


Figura 20. Principales rutas de transporte a través de la BHE (Modificado de Abbott et al., 2010).

## 6.2 Transportadores ABC

Los transportadores ABC fueron descubiertos por los oncólogos cuando observaron la resistencia de ciertos tumores previamente tratados con diferentes fármacos antineoplásicos a otros agentes citotóxicos. Al añadir células de estos tumores resistentes a un cultivo de células normales, éstas adquirirían las mismas propiedades resistentes (Biedler and Riehm, 1970). En este estudio, Biedler y Riehm observaron que células cancerosas que habían preincubado con actinomicina D eran resistentes a diversos agentes farmacológicos. Basado en esto, este fenotipo de las células resistentes a fármacos se denominó MDR (del inglés *multidrug resistance*).

Desde entonces, se han descubierto varias proteínas transmembrana que juegan un papel en esta resistencia. Estas proteínas se encuentran en células cancerosas pero también en diferentes tejidos sanos como hígado, riñón, tracto gastrointestinal o cerebro. Los transportadores ABC representan una gran parte de estas proteínas transmembrana y parecen ser de gran importancia en la función normal de órganos y tejidos ya que mutaciones en estas proteínas pueden causar enfermedades genéticas (Albrecht et al., 2005; Martínez-Mir et al., 1998).

### 6.3 Estructura y mecanismo de acción de los transportadores ABC

En humanos se han descrito hasta la fecha 48 transportadores ABC. Su clasificación se ha realizado basada en dominios de organización y en homología genética en 7 subfamilias que son, ABC1, MRD/TAP, MRP, ALD, OABP, GCN20, White (Abbott et al., 2010).

Para ser funcionales, los transportadores ABC requieren por lo menos 4 dominios, de los cuales dos son dominios transmembrana (TMD) que forman el lugar de unión a ligando, y dos dominios de unión a nucleótido (NBD) que hidrolizan ATP para translocar el ligando unido. Estos dominios NBD pero no los TMD son homólogos en toda la familia.

En general, los transportadores ABC mantienen una estructura bastante relacionada entre ellos (figura 21), siendo sus principales diferencias el número de dominios TMD, NBD y sus lugares de glicosilación.

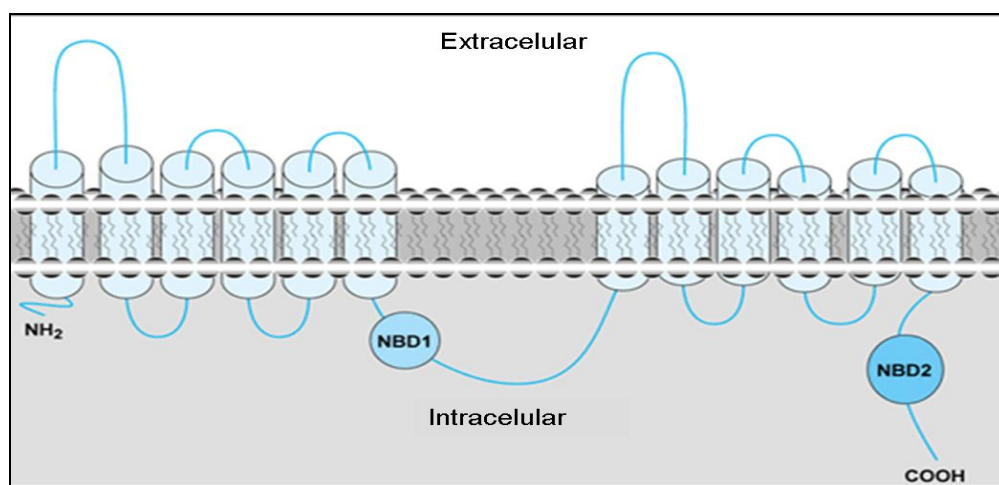


Figura 21. Estructura básica de un transportador ABC.

Cómo se une el sustrato y su transporte por parte de los transportadores ABC todavía no se conoce del todo, pero está aceptado que el modelo de *ATP switch* es el modo de acción que adoptan los transportadores (Higgins and Linton, 2004). Este modelo presenta dos conformaciones para los NBDs. Cuando están unidos a dos moléculas de ATP, el dímero que forman se encuentra cerrado, mientras que cuando ese ATP es hidrolizado a ADP, el dímero se disocia y se abre. El cambio entre las conformaciones abierta y cerrada induce un cambio conformacional en los TMDs con la consiguiente translocación del sustrato.

En el estado basal de los transportadores ABC los NBDs se encuentran en la configuración de dímero abierto, con poca afinidad por el ATP. Esta configuración permite que se forme una cámara accesible al interior del transportador. El transporte comienza cuando se une un ligando al sitio de alta afinidad de los TMDs lo que induce un cambio conformacional que aumenta la afinidad de los NBDs por el ATP. Entonces, dos moléculas de ATP se unen cooperativamente para inducir el cambio a la configuración cerrada. Este cambio hace que los TMDs se abran formando una cavidad abierta al lado opuesto al inicial. La afinidad del sustrato por el TMD se reduce, y se libera. Se produce después la hidrólisis del ATP y el transportador vuelve a su estado basal (figura 22)

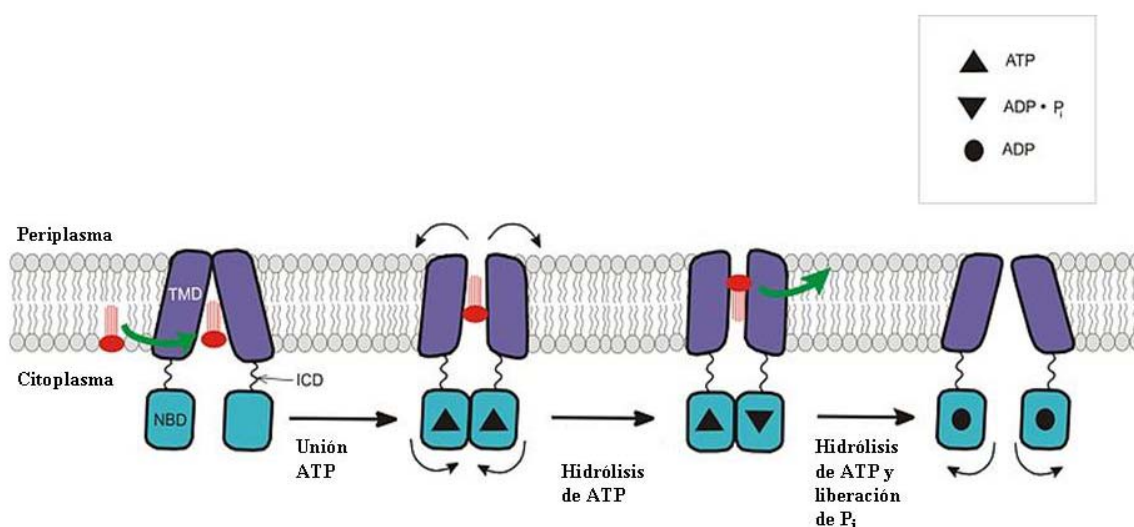


Figura 22. Esquema del mecanismo de acción de los transportadores ABC.

#### 6.4 Distribución en el cerebro y regulación

En el SNC se expresan varios transportadores ABC, como Mdr-1 (también conocido como P-glicoproteína, o ABCB1) ó Mrp-1 (también conocido como ABCC1), cuya función sería prevenir la captación de compuestos tóxicos y facilitar su eliminación (Borst and Elferink, 2002; Löscher and Potschka, 2005). En el cerebro, los transportadores ABC se expresan principalmente en las células endoteliales (Demeule et al., 2001; Soontornmalai et al., 2006). Además del tipo celular en que se expresen, su localización subcelular es muy importante para su actividad y función. Así, los transportadores ABC involucrados en la resistencia a múltiples fármacos se localizan predominantemente en la membrana luminal de las células (van Helvoort et al., 1996). Es más, las condiciones patológicas del SNC juegan un papel importante en la expresión de los transportadores

ABC, en su función, y en su distribución. Así pues, en algunas enfermedades del SNC, se ha encontrado que los transportadores ABC se expresan en neuronas, astrocitos, y microglia además de en las células endoteliales (Lee et al., 2001; Pardridge et al., 1997; Seegers et al., 2002).

La localización de estas proteínas ha sido controvertida. En un principio se encontraron los transportadores ABCB1, Mrp-2 (también conocido como ABCC2), Mrp-4 y MXR (también conocido como ABCG2) en la membrana plasmática luminal de las células endoteliales de la BHE. Por otra parte, en la membrana plasmática abluminal se localizaron los transportadores ABCC1, Mrp-3 y Mrp-5 (también conocido como ABCC5) (Borst and Elferink, 2002). Otros estudios mostraron que la localización subcelular de ABCC1 y ABCC5 era luminal mientras que la de Mrp-4 era abluminal (Löscher and Potschka, 2005). Sin embargo, usando inmunofluorescencia de alta resolución (Soontornmalai et al., 2006) se mostró que ABCB1 y ABCC5 se expresaban en la cara luminal mientras que ABCC1 se expresaba en la abluminal. ABCC2 se encontró tanto en la cara luminal y abluminal y Mrp-3 no se detectó.

Así pues, parece que ABCB1 y ABCC5 se encuentran en la membrana luminal mientras ABCC1 se encuentra en la membrana abluminal, y que ABCC2 se encuentra en las dos membranas (figura 23).

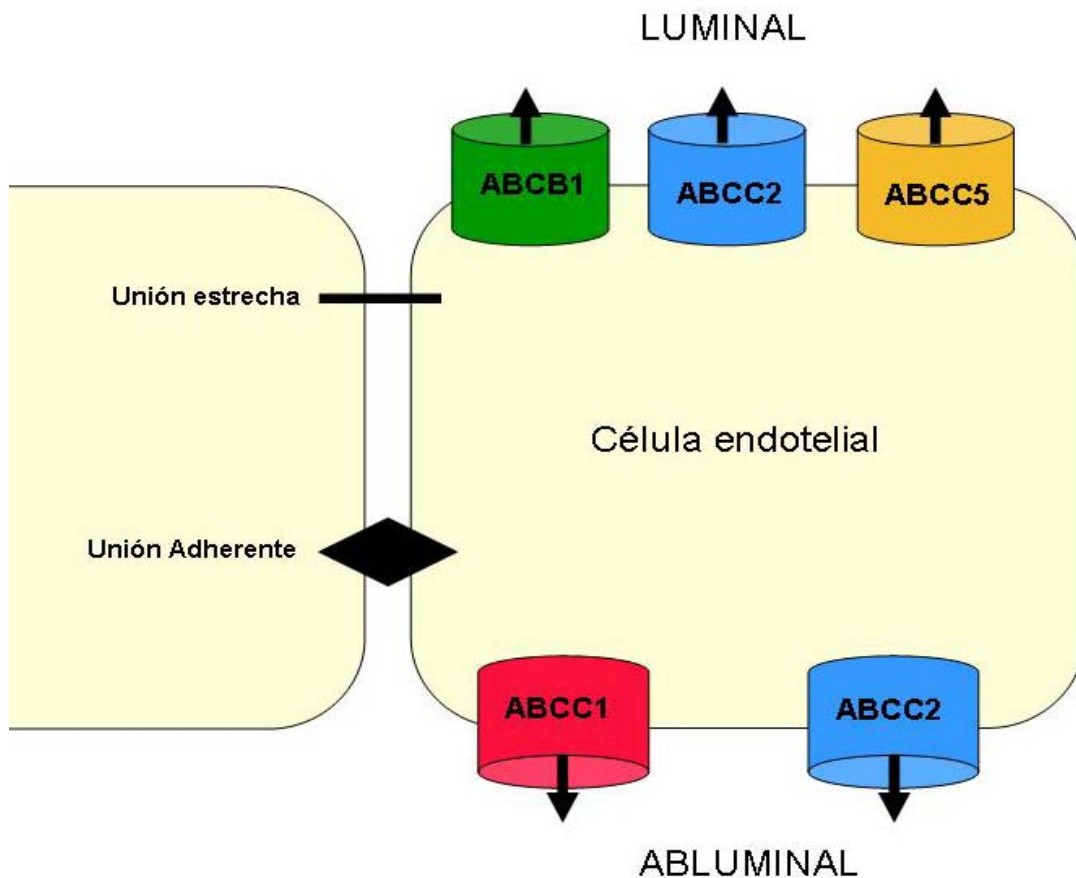


Figura 23. Representación esquemática de la localización de algunos transportadores ABC.

La regulación de los transportadores ABC es muy compleja y los mecanismos moleculares que controlan su expresión fisiológica se conocen muy poco.

Bajo condiciones patológicas, varias rutas de señalización inespecíficas han sido involucradas en la regulación de estas proteínas. Entre ellas JNK-1/2, p38, ERK-1/2, PKC, Akt, NFκB, y COX-2 regulan al alza la expresión de ABCB1 (Bauer et al., 2007; Hartz et al., 2008; Nwaozuzu et al., 2003; Zhou et al., 2006), mientras que p-53 regula a la baja la expresión de ABCC1 (Wang and Beck, 1998).

Recientemente se ha demostrado en un modelo de isquemia, que ApoE regula la expresión de ABCB1 y ABCC1 a nivel transcripcional, a través del receptor de ApoE 2 (ApoER2) y de JNK1/2 en microvasos cerebrales de ratón (ElAli and Hermann, 2010). En este estudio observaron que la expresión de ABCB1 aumentaba mientras que la de ABCC1 disminuía.

Por tanto, podríamos decir que los transportadores ABC son susceptibles de ser regulados por varias vías en respuesta a un estrés en el parénquima cerebral.

### **6.5 Funciones fisiológicas**

Los transportadores ABC que se conocen tienen afinidad por sustratos lipófilos y anfipáticos como son las toxinas bacterianas, vegetales, y fúngicas, y por las sustancias carcinógenas, por lo que, se consideran sistemas de detoxificación (Leslie et al., 2005). En algunos órganos como el cerebro, los testículos o la placenta, la función de los transportadores ABC es proteger dichos órganos de compuestos tóxicos. En cambio, en otros órganos como el intestino o el riñón, estos transportadores bombean a la sangre compuestos biológicamente activos producidos en estos órganos.

La función fisiológica exacta del transportador ABCB1 no se conoce todavía, pero lo que sí se sabe es que protege a los órganos de xenobióticos tóxicos. Algunos estudios mostraron que otras funciones de este transportador podrían ser el transporte de fosfolípidos y glicoesfingolípidos simples de la membrana plasmática al espacio extracelular (Orlowski et al., 2006; Sharom et al., 2005). El transportador ABCB1 puede contribuir también a la eliminación del péptido hidrófobo Aβ asociado a membrana (Burk et al., 2005; Vogelgesang et al., 2004). En cambio, no parece jugar un papel esencial en la supervivencia celular, ya que los ratones *knock out* de ABCB1a no presentan una viabilidad reducida. Sin embargo, se ha observado que el cerebro de estos ratones presenta una mayor sensibilidad que el de los ratones *wild type* a compuestos citotóxicos o neurotóxicos debido a

su mayor acumulación. Igualmente, en otros tejidos se alcanzan niveles más elevados de diferentes fármacos en los animales *knock out* que en los *wild type* (Schinkel et al., 1994; Schinkel et al., 1996; Schinkel et al., 1995; Smit et al., 1999).

De la misma manera que para el ABCB1, la función fisiológica exacta del ABCC1 sigue sin conocerse del todo, pero se ha sugerido que podría ser un transportador del leucotrienos C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) debido a la alta afinidad que tiene por ellos, y a la reducida liberación de LTC<sub>4</sub> por parte de eosinófilos y mastocitos en condiciones inflamatorias en ratones *knock out* de ABCC1 (Wijnholds et al., 1997). También se ha sugerido que este transportador tiene funciones en la detoxificación celular, ya que se ha demostrado que en animales *knock out* para ABCC1 el paso de sustancias de la sangre al fluido cerebroespinal está incrementado respecto a los animales *wild type* (Wijnholds et al., 2000).



# **RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DE ESTRÉS**

## 1. Rutas de señalización de estrés

La exposición a un estrés requiere respuestas adaptativas rápidas y eficientes para maximizar la supervivencia celular. Es por esto que las células poseen mecanismos sensoriales y sistemas de transducción de señales diseñados para actuar frente al estrés.

Las cascadas de MAPK (del inglés *mitogen-activated protein kinase*) son una familia de Ser/Thr proteínas quinasas altamente conservadas en eucariotas e implicadas en procesos biológicos como proliferación, diferenciación, movimiento y muerte celular (Plotnikov et al., 2011). En cada cascada participan 3 quinasas principales (MAP3K, MAPKK, MAPK), que propagan la señal mediante fosforilaciones secuenciales de las proteínas que sirven de sustrato (figura 24). Las MAP3K se activan interaccionando con una familia de pequeñas GTP-asas y/o con otras quinasas que conectan las estructuras MAPK con los receptores de superficie o estímulos externos (MAP4K).

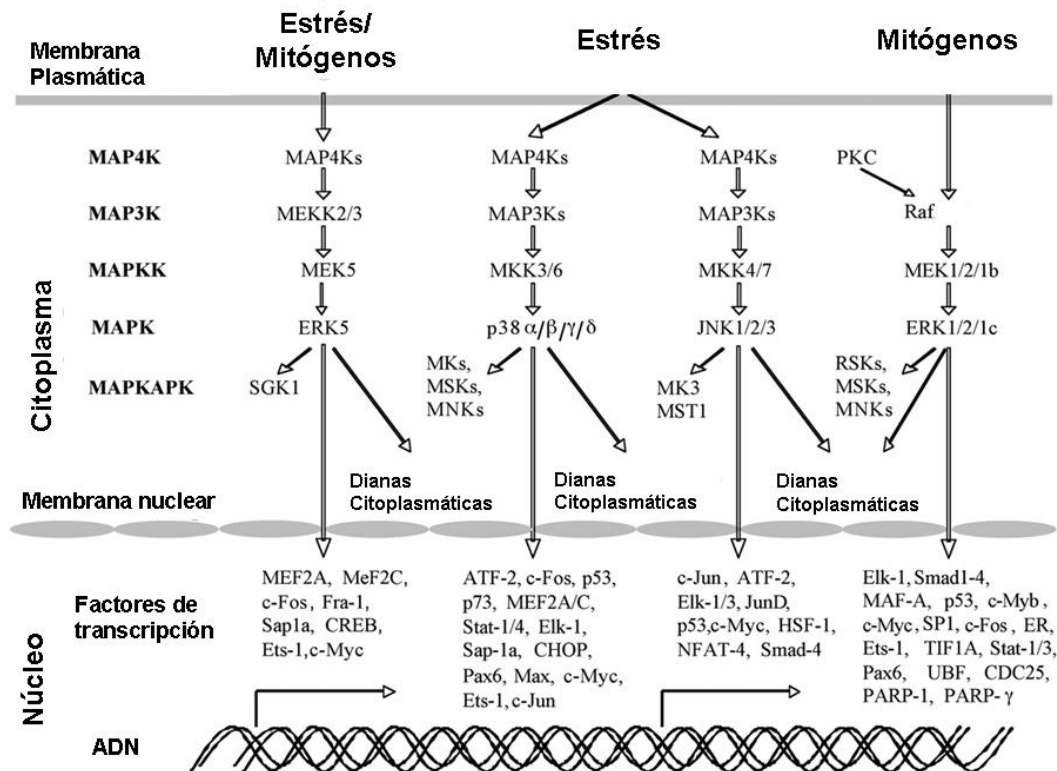


Figura 24. Representación esquemática de las cascadas de MAPK y sus dianas nucleares (Modificado de Plotnikov, 2011).

Hasta la fecha, se han identificado en mamíferos 4 diferentes cascadas de señalización MAPK: ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1 and 2*), JNK (*c-jun N-terminal Kinase*), p38, y ERK5.

Las vías de ERKse relacionan principalmente con crecimiento y diferenciación celular, aunque también están involucradas en plasticidad neuronal, supervivencia y determinación de la morfología (Yoon and Seger, 2006). JNK y p38 en cambio, median respuestas a estrés, entre ellas, apoptosis, respuesta inflamatoria y transmisión de señales inhibitoras del crecimiento (Schaeffer and Weber, 1999).

La vía de JNK ó SAPK (*Jun N-terminal kinases / stress-activated protein kinases SAPK*) es activada por distintos factores de estrés, citoquinas inflamatorias, y factores de crecimiento (figura 25), que actúan sobre MAP3K (MEKK1/4 y MLK) bien directamente o a través de MAP4K. MAP3K fosforila a MKK4 y MKK7, que a su vez estimulan la actividad quinasa de JNK por fosforilación directa de residuos tirosina y treonina. p-JNK se transloca al núcleo, donde modifica la actividad de distintos factores transcripcionales como c-Jun, ATF-2, ELK 1, SMAD4, NFAT4, NFATC1 y p53.

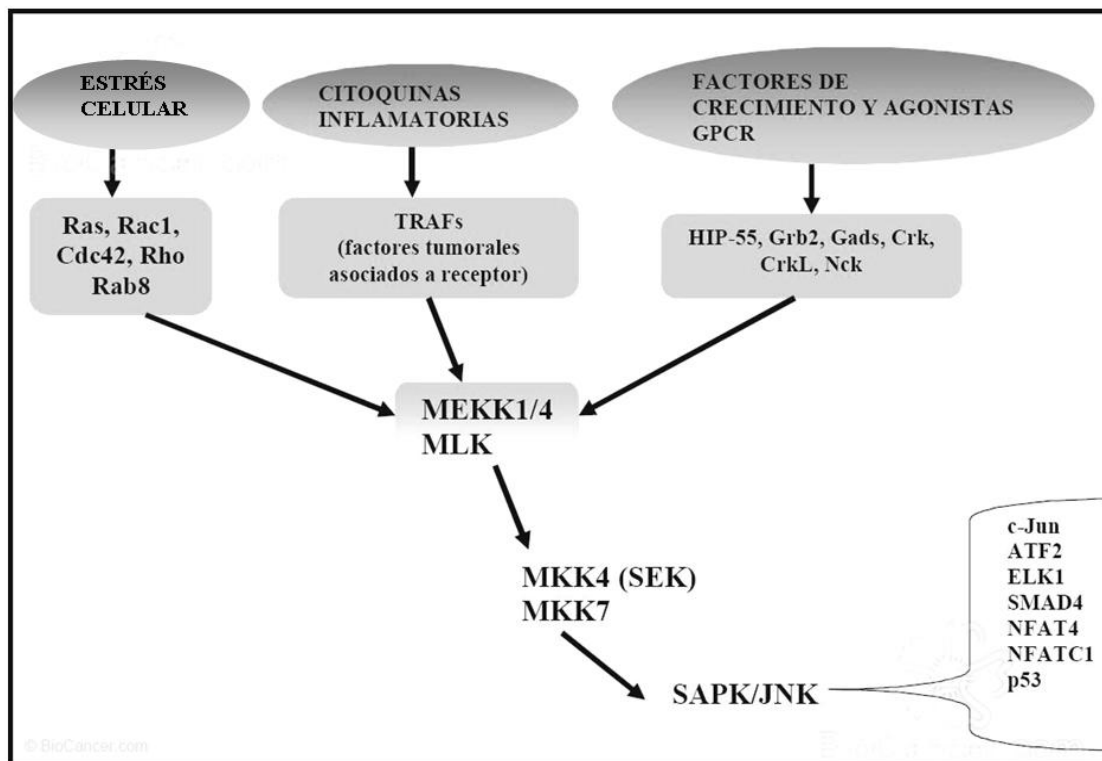


Figura 25. Esquema representativo de la vía de JNK.

Estos factores de transcripción activados regulan apoptosis, respuesta inmune, actividad neuronal, y señalización de insulina, entre otros (Plotnikov et al., 2011).

Alteraciones en esta regulación de JNK están involucradas en varias patologías. Entre las enfermedades neurodegenerativas se incluyen la enfermedad de Alzheimer, isquemia cerebral, enfermedad de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica. JNK también juega un papel en otro tipo de enfermedades no neurodegenerativas como son la diabetes, inflamación, o diferentes tipos de cáncer (Kim and Choi, 2010; Tanti and Jager, 2009; Zhang and Kaufman, 2008).

Tal y como hemos mencionado en apartados previos en la introducción, el estrés celular altera las propiedades de la BHE, tanto respecto a su estructura como a su función. Uno de los mediadores de estos cambios es JNK.

La activación de JNK mediante su fosforilación se ha involucrado en el control de la expresión de diversos transportadores ABC en la BHE en ratones en modelos *in vivo* de isquemia cerebral y toxicidad dopaminérgica inducida por metanfetamina (ElAli and Hermann, 2010; Elali A, 2012). Estos transportadores son imprescindibles en la homeostasis del cerebro ya que lo protegen de la acumulación de sustancias tóxicas.

Diferentes citoquinas pro-inflamatorias inducen la activación de JNK cuyo efecto final es la regulación de MMP-9, entre otras proteínas. En este sentido recientemente se ha observado que JNK modula la expresión de MMP-9 en cultivos de astrocitos cerebrales de una forma dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la vía interleuquina  $1\beta$ /CAMKII (Wu et al., 2009). *In vivo* se ha demostrado en ratones que la inhibición de interleuquina  $1\beta$  disminuye los niveles de MMP-9 y JNK fosforilada, así como la ruptura de la BHE en un modelo de hemorragia subaracnoidea (Sozen et al., 2009).

También se ha involucrado a  $\text{TNF-}\alpha$  en la regulación de MMP-9 en células vasculares de músculo liso en modelos de aneurisma abdominal aórtico tanto *in vitro* (rata, humano) como *in vivo* en ratón (Yoshimura et al., 2005).

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

**Hipótesis**

La administración de metanfetamina produce cambios inmediatos sobre la matriz extracelular de la lámina basal que comprometen la integridad de la BHE. Estos cambios permiten la extravasación de proteínas plasmáticas al parenquima cerebral. Ambos efectos podrían estar causados por un incremento en la actividad de metaloproteinasas como consecuencia de un aumento en la fosforilación de JNK1/2. Como ocurre en otros modelos de neuroinflamación, alteraciones en la permeabilidad de la BHE y un incremento en la actividad de metaloproteinasas podrían contribuir a la neurotoxicidad a largo plazo inducida por metanfetamina que se refleja por una disminución en la densidad de terminales nerviosos dopaminérgicos.

**Objetivos**

El objetivo de este estudio es doble: 1) Evaluar los cambios inducidos por metanfetamina sobre la actividad de metaloproteasas y sobre la integridad de la BHE en el estriado de ratón y su regulación por JNK1/2, y 2) Establecer una relación entre dichos cambios y la respuesta neurotóxica que induce la droga en el estriado de ratón a largo plazo. Estos objetivos se desglosan en los siguientes sub-objetivos:

1. Determinar el curso temporal de la expresión y activación de MMP-9 y MMP-2, de la expresión de su sustrato laminina y de la extravasación de IgG al parénquima cerebral tras la administración de metanfetamina.
2. Determinar el curso temporal de la activación de JNK1/2 tras la administración de metanfetamina.
3. Estudiar el efecto de SP600125, inhibidor de JNK1/2, sobre la activación de MMP-9 y de MMP-2, la degradación de laminina, y la extravasación de IgG al parénquima cerebral inducidas por metanfetamina.
4. Estudiar el efecto de BB-94 sobre la degradación de laminina y la extravasación de IgG al parénquima cerebral inducidas por metanfetamina.
5. Determinar el efecto de BB-94 y SP600125 sobre la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por metanfetamina.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. Animales utilizados

Se utilizaron ratones macho adultos C57BL/6J (figura 26) con un peso inicial comprendido entre 25-30g (Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona) de aproximadamente 12 semanas de edad. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura ( $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y humedad (50-55 %), con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h y teniendo libre acceso a comida y agua, en el animalario de la Universidad Complutense de Madrid.

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a la normativa estipulada por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense y conforme a la Regulación Europea y Española, Directiva Europea 2003/65/CE, Real Decreto Español 1201 del 2005, ley 32/2007, del 7 de noviembre (B.O.E. nº 268, 8 de noviembre de 2007).

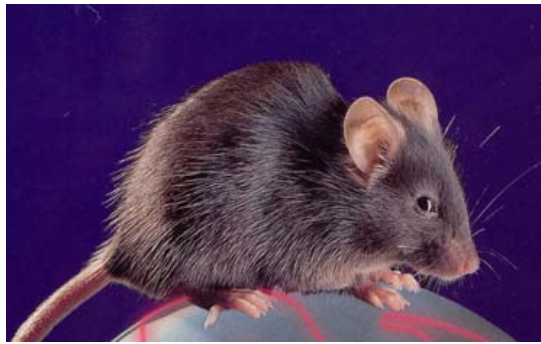


Figura 26. Ratón C57BL/6J

## 2. Diseño experimental

Los estudios llevados a cabo se centraron en el estriado del ratón ya que es una estructura con una densa innervación dopaminérgica muy susceptible al daño neuronal producido por metanfetamina.

### **2.1 Estudio del efecto de metanfetamina sobre la expresión y actividad de MMPs, la integridad de la BHE. Implicación de estos factores en la neurotoxicidad causada por la droga**

#### **2.1.1 Estudio temporal de la activación de las MMPs e integridad de la BHE**

En base a una curva dosis-respuesta obtenida previamente en nuestro laboratorio (Granado et al., 2010), se decidió administrar a los ratones un régimen neurotóxico consistente en 3 inyecciones por vía intraperitoneal (i.p) de 4 mg/kg de metanfetamina espaciadas 3 h. La droga se disolvió en suero



salino (0.9 %) y se inyectó en un volumen de 10 ml/kg. Los animales del grupo control recibieron suero salino (0.9 %) i.p en el mismo volumen. Se escogió esta dosis porque causa una significativa toxicidad dopaminérgica con una mortalidad mínima.

Se estudió el efecto de metanfetamina sobre la fosforilación de JNK1/2, la expresión y actividad de MMP-2 y MMP-9, y la integridad de la BHE.

Para ello se administró metanfetamina a los ratones y se sacrificaron 1, 3, y 24 h tras la última administración de la droga (figura 27).

La activación de JNK1/2 se evaluó por Western blot mediante el análisis de la expresión de su forma fosforilada. La actividad y localización de MMP-2 y MMP-9 se estudiaron mediante zimografía en gel y zimografía *in situ* y su expresión por Western blot.

La integridad de la BHE se evaluó analizando la extravasación de IgG endógena mediante inmunofluorescencia, y los niveles de la proteína laminina mediante Western blot.

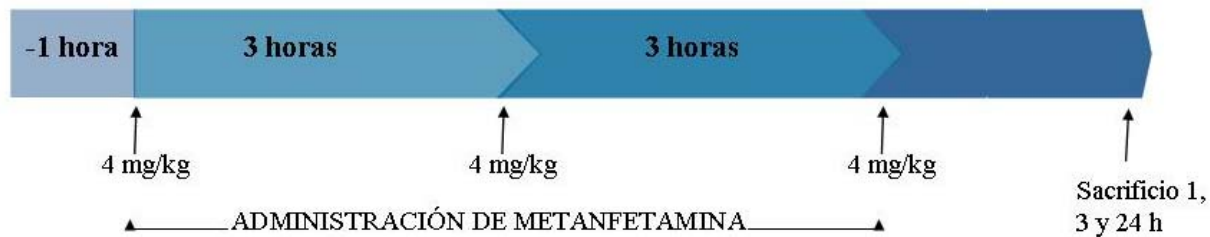


Figura 27. Esquema de la administración de metanfetamina.

### 2.1.2 Estudio de la implicación de JNK1/2 en la activación de MMP-9 y la integridad de la BHE

En este estudio se administró el inhibidor de JNK1/2 SP600125 (30 mg/kg) disuelto en DMSO (20%) por vía i.p inmediatamente antes de la última inyección de metanfetamina (figura 28). Los animales control recibieron el mismo vehículo.

Los animales se sacrificaron 1 y 3 h tras la última administración de la droga. La actividad de MMP-9 se analizó mediante zimografía en gel, y se midieron los niveles de laminina y los de JNK1/2 fosforilada por Western blot. La extravasación de IgG endógena se cuantificó por inmunofluorescencia.

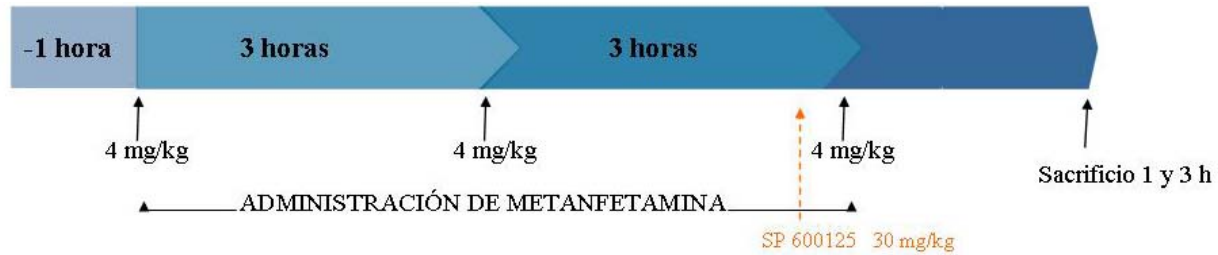


Figura 28. Esquema de la administración de SP600125 y metanfetamina.

### 2.1.3 Estudio de la implicación de MMP-9 en la integridad de la BHE

Para estudiar la implicación de MMP-9 en el aumento de permeabilidad de la BHE inducido por metanfetamina se administró el inhibidor de MMPs Batimastat (BB-94) por vía i.p 30 minutos antes de la primera y última inyección de la droga a una dosis de 50 mg/kg (figura 29). Se suspendió en PBS + Tween 20 (0.01%). Los animales control recibieron el mismo vehículo.

Los animales se sacrificaron 1 h después de la última inyección de metanfetamina y se analizaron los niveles de laminina por Western blot, y la extravasación de IgG al parénquima por inmunofluorescencia.

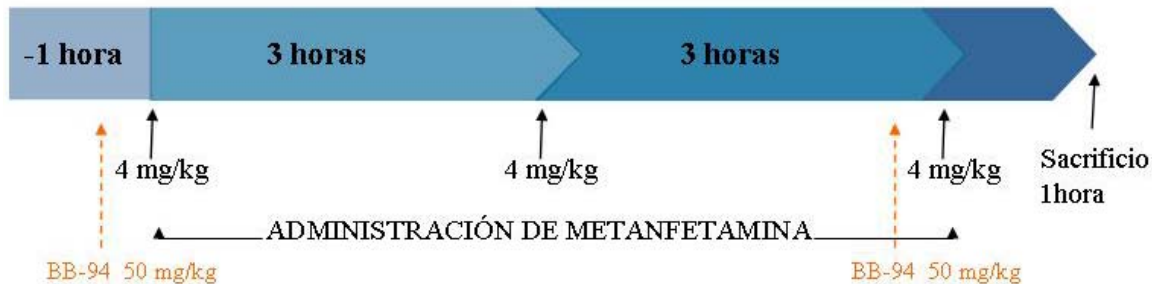


Figura 29. Esquema de la administración de BB-94 y metanfetamina.

### 2.1.4 Estudio de la implicación de la activación de MMP-9 y JNK1/2 en la neurotoxicidad inducida por metanfetamina

En este estudio se administraron los inhibidores de JNK1/2 SP600125 (30 mg/kg) y MMP-9 BB-94 (50 mg/kg) siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Los controles recibieron los vehículos correspondientes.

Los animales fueron sacrificados 7 días después de la administración de metanfetamina (figura 30). Como marcadores de toxicidad dopaminérgica se analizaron los niveles de DA, DOPAC, y HVA

por h.p.l.c, y la densidad del transportador de DA (DAT) mediante la técnica de fijación del radioligando [ $^3\text{H}$ ]-WIN 35,428.

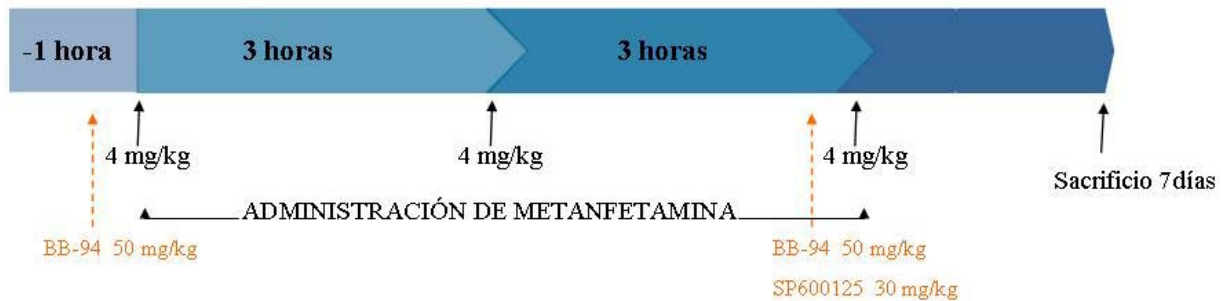


Figura 30. Esquema de la administración de SP600125 y BB-94 en el estudio sobre neurotoxicidad.

#### 2.1.5 Estudio del efecto de la temperatura ambiente sobre la actividad de MMP-9 y expresión de laminina

Para este estudio se mantuvieron a los animales en un ambiente de baja temperatura (4 °C) 2 h antes de la administración de metanfetamina hasta 3 h después de la última inyección. Los animales fueron sacrificados 1 y 3 h después de la última administración de la droga (figura 31).

La actividad de MMP-9 se analizó mediante zimografía en gel, y la expresión de laminina se cuantificó por Western blot.

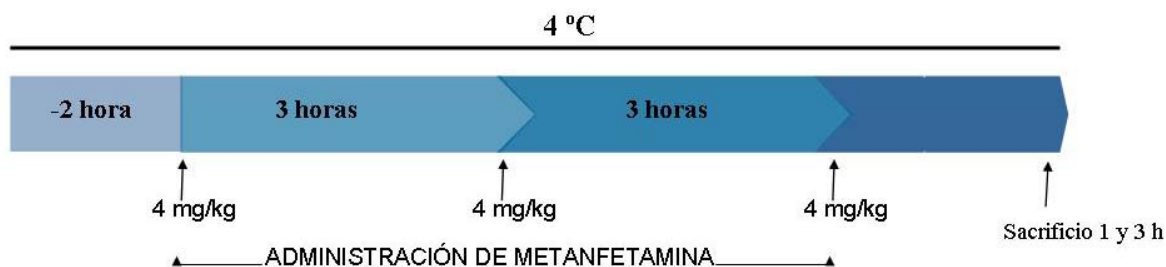


Figura 31. Esquema de la administración de metanfetamina a animales mantenidos a una temperatura ambiente baja.

#### 2.1.6 Estudio de los cambios inducido por metanfetamina sobre la presión arterial

Para comprobar si los cambios producidos en la BHE pudieran deberse a cambios en la presión arterial, ésta se midió antes de la administración de la droga, después de cada una de las inyecciones, y 24 h más tarde (figura 32).

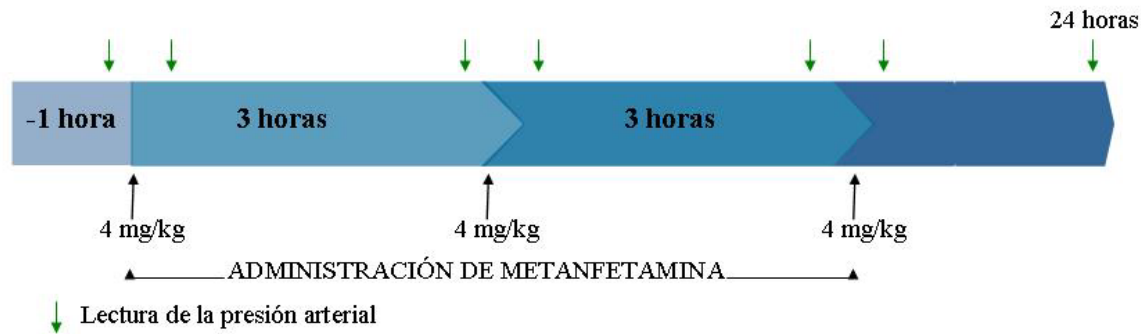


Figura 32. Esquema de la medición de la presión arterial.

### 3. Medición de la temperatura rectal

La temperatura rectal de los animales se monitorizó en todos los experimentos, dada la importancia que tiene la hipertermia en los efectos producidos por metanfetamina.

La medida de la temperatura rectal fue realizada con una sonda rectal especialmente indicada para ratón (RET-2, Physitemp Instruments, NJ, U.S.) conectada con un lector digital (BAT-12, Physitemp), con una resolución de  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$  y una precisión de  $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$  unido a un sensor RET-3 para roedores que se introduce 2 cm en el recto del ratón mientras que el animal es ligeramente inmovilizado con la mano. La lectura se realizó hasta que la medida de la temperatura rectal fuera estable.

Se midió la temperatura antes de la administración de la droga y durante las 7 h siguientes.

### 4. Medición de la presión arterial

La presión arterial de los animales fue monitorizada antes de la administración de la droga y después de cada inyección de la droga, así como 24 h después de la última administración de metanfetamina. Los animales fueron anestesiados con uretano (1 g/kg) 30 minutos antes del experimento y dispuestos sobre una manta homeotérmica a  $37^{\circ}\text{C}$  (Harvard Apparatus) para prevenir la hipotermia inducida por la anestesia. Se escogió el uretano porque es el anestésico que menos efectos tiene sobre la presión arterial (Maggi and Meli, 1986). La presión arterial media se registró usando un

sistema Laboratory-Trax-4/24T (World Precision Instruments) a través de un catéter de polietileno insertado en la arteria femoral derecha.

## 5. Estudios de expresión proteica

### 5.1 Extracción y homogenización de la muestra

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y decapitación 1, 3 ó 24 h tras la administración de metanfetamina. Se extrajo el cerebro y se diseccionó sobre hielo picado para obtener el estriado. Las estructuras cerebrales extraídas se congelaron rápidamente sobre hielo seco y se guardaron a -80 °C hasta el día del ensayo. Las muestras se pesaron en una balanza de precisión (Electronic Balance BP61S, Sartorius, Alemania). El tejido fue homogenizado en tampón de lisis (150mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1 % Nonidet P40, pH 7.4) al que se añadió un cóctel de inhibidores de proteasas al 5 % (p8340) y de fosfatasa al 1 % (p5726) (Sigma, Madrid, España). Las muestras después fueron alicuotadas, su concentración de proteína medida por el método de DC<sup>TM</sup> Protein Assay y almacenadas a -80 °C hasta el momento de su utilización.

### 5.2 DC<sup>TM</sup> Protein Assay

La medición de la concentración proteica de las muestras homogeneizadas con un 1 % de Nonidet P40 se realizó según las indicaciones del manual del DC<sup>TM</sup> Protein Assay (Bio-Rad) utilizando una curva estándar de BSA (0-1.5 mg/ml). Se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm (lector de placas Elx 808, Bio-tek, Instruments, INC., EE.UU.).

### 5.3 Western blot

La determinación de la expresión proteica se realizó mediante la técnica de Western blot. 10 µg de proteína fueron hervidos en tampón de carga 4x (250 mM Tris-HCL, pH 6,8, 20 % SDS, 10 % glicerol, 8 % β-mercaptoetanol y azul de bromofenol,) a 95°C durante 5 minutos, y separados mediante SDS-PAGE. Tras la electroforesis se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF (tamaño de poro 0.45µm, Hybond-P, GE Healthcare, España) en tampón de transferencia (25 mM Tris-HCL, 192 mM glicina, 20 % metanol). Para minimizar las uniones inespecíficas de los anticuerpos a la membrana, se incubaron las membranas en tampón TBS con 0.1 % de Tween 20

(TBST) y 5 % de leche desnatada a temperatura ambiente durante un mínimo de 1 h. Se añadieron después los correspondientes anticuerpos primarios (tabla 4) y se incubaron a 4 °C en agitación durante toda la noche.

Posteriormente se realizaron 3 lavados en TBST para eliminar restos de anticuerpo y uniones inespecíficas. A continuación se incubaron las membranas con su correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (tabla 5) durante 2 h a temperatura ambiente. Tras la incubación con el secundario se realizaron 3 lavados en TBST. Se confirmó que la cantidad de proteína cargada fue la misma mediante la detección del control de carga, la proteína  $\beta$ -actina.

La inmunoreactividad de las bandas se detectó mediante un sistema de quimioluminiscencia para Western blot (ECL Plus™ Western blotting detection kit, GE Healthcare, España) seguido de la exposición de las membranas a una película de revelado (Hyperfilm ECL, GE Healthcare, España).

La cuantificación de las bandas se realizó mediante el programa Image J Software versión 1.42q (NIH, Maryland, USA) y se refirió a la inmunoreactividad de la  $\beta$ -actina.

Los niveles de proteína se calcularon respecto al porcentaje de la media de los animales control.

Anticuerpo anti-	Referencia	Huésped	Dilución	Casa comercial
$\beta$ -actina	A5441	Ratón	1/1000	Sigma
JNK1/2	9252	Conejo	1/1000	Cell Signaling
p-JNK1/2 <sup>Thr183/Tyr185</sup>	9255	Conejo	1/1000	Cell Signaling
laminina	L-9393	Conejo	1/1000	Sigma
MMP-2	Ab19015	Conejo	1/1000	Abcam
MMP-9	AB19016	Conejo	1/1000	Abcam

Tabla 4. Resumen de los anticuerpos primarios utilizados.

Anticuerpo anti-	Referencia	Huesped	Dilución	Casa Comercial
Anti-mouse IgG HRP	NA931V	Oveja	1/5000	Amersham
AlexaFluor™ 594 anti-mouse IgG	A21203	Burro	1/1000	Invitrogen

Tabla 5. Resumen de los anticuerpos secundarios utilizados.

## 6. Estudios de actividad metaloproteinasa.

La determinación de la actividad de las metaloproteinasas se llevó a cabo mediante dos procedimientos complementarios: la zimografía en gel y la zimografía *in situ*.

### 6.1 Zimografía en gel

Las muestras obtenidas previamente se sometieron a zimografía en gel en la que las proteínas se separan en función de su peso por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS) no reductoras. La separación se realiza en un gel de poliacrilamida que contiene un sustrato específico de la metaloproteinasa a analizar, y que se co-polimeriza con la acrilamida. Durante la electroforesis, el SDS provoca la desnaturalización del enzima y por tanto su inactivación. Tras la electroforesis, el gel se lava en un tampón que contiene Triton<sup>®</sup> X-100 y que retira el SDS, con lo que el enzima se renaturaliza y vuelve a estar activa. El gel entonces es incubado a 37 °C en el tampón en el mismo tampón que el de lavado pero sin Triton<sup>®</sup> X-100. Durante esta incubación, el enzima renaturalizado degrada el sustrato en el gel. El gel después de la incubación se tiñe y las MMPs aparecen como bandas claras (donde el sustrato ha sido degradado) sobre un fondo azul (donde el sustrato no ha sido degradado). Las bandas claras en el gel pueden ser cuantificadas y densitometradas (Snoek-van Beurden and Von den Hoff, 2005).

Se separaron 15 µg de proteína tampón de carga 4x en condiciones no reductoras (250 mM Tris-HCL pH 6,8, 20 % SDS, 10 % glicerol y azul de bromofenol) y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos antes de ser cargadas en un gel al 9 % con 1 % de gelatina. Tras la electroforesis, se eliminó el SDS con tampón de lavado (50 mM Tris-HCl, 6 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.5 µM ZnCl<sub>2</sub>, 2.5 % Triton<sup>®</sup> X-100, pH 7,4) durante 1 h en agitación a temperatura ambiente, y después se incubó a 37°C en tampón de incubación (50 mM Tris-HCl, 6 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.5 µM ZnCl<sub>2</sub>, pH 7,4) durante 18 h, condiciones en las que la actividad del enzima produce la degradación de la gelatina. Posteriormente se tiñó el gel con Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad) durante 10 minutos, hasta conseguir un teñido del gel uniforme. Posteriormente se destiñó el gel con la solución de destiñido (10 % ácido acético, 40 % metanol, 50 % H<sub>2</sub>O) hasta observar las bandas claras sobre un fondo oscuro. Se transfirió entonces el gel a la solución de STOP (90 % H<sub>2</sub>O, 10 % ácido acético) y se digitalizó en escala de grises. La imagen tomada entonces fue densitometrada y cuantificada.

La cuantificación de las bandas se realizó mediante el programa Image J Software versión 1.42q (NIH, Maryland, USA).

### **6.2 Zimografía *in situ***

La zimografía *in situ* es una técnica que permite localizar la actividad de MMPs en cortes histológicos.

Para realizar esta técnica los ratones fueron sacrificados, el cerebro se extrajo rápidamente, se congeló en hielo seco y se guardó a -80°C. Los cerebros se embebieron en Tissue-Tek® y se cortaron en el criostato en secciones de 20 µm de grosor. Se guardaron después a -80°C hasta su uso. Tras atemperar los cortes durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron 2 veces durante 5 minutos con PBS. A continuación, los cortes se incubaron con gelatina DQ como sustrato fluorogénico (EnzCheck® *gelatinase assay kit*, Invitrogen) en tampón Tris-CaCl<sub>2</sub> (50 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM ZnCl<sub>2</sub>) en cámara húmeda en oscuridad durante 1 h a 37°C. Después se lavaron de nuevo con PBS 3 veces durante 5 minutos para limpiar los cortes y se montaron con el medio para inmunofluorescencia ProLong®Gold (P36930, Invitrogen, España)

Los cortes se examinaron al microscopio de fluorescencia (Zeiss Axio Imager A1) y las imágenes se obtuvieron a 40x. Por cada animal se tomaron 8 campos. La actividad proteolítica se detectó como fluorescencia verde, que indica la degradación del sustrato. Las imágenes fueron analizadas con el programa Image J Software versión 1.42q (NIH, Maryland, USA).

## **7. Estudios de extravasación de IgG**

Como marcador de alteraciones en la permeabilidad de la BHE se utilizó la extravasación de IgG del torrente sanguíneo al parénquima cerebral.

Los cortes histológicos fueron obtenidos como se ha descrito previamente. Tras atemperar los cortes durante 30 minutos a temperatura ambiente, se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 30 minutos. Se lavaron después 3 veces durante 5 minutos en PBS con un 0.1 % de Triton® X-100 (PBST), y se incubaron con solución de bloqueo (0.5 % BSA, 10 % suero de caballo, 0.1 % Triton® X-100) durante 1 h a temperatura ambiente.

Posteriormente se incubaron los cortes con el anticuerpo secundario fluorescente AlexaFluor™ 594 donkey anti-mouse IgG (1:1000) en PBST en una cámara húmeda en oscuridad durante 18 h a 4°C.



Tras lavar el anticuerpo mediante 3 lavados con PBST, se montaron con el medio de montaje para inmunofluorescencia ProLong®Gold. Los cortes se examinaron al microscopio de fluorescencia (Zeiss Axio Imager A1) y las imágenes se obtuvieron con el objetivo de 40x. Por cada animal se tomaron imágenes de 8 campos y fueron convertidas a escala de grises. Se midió la densidad integrada de las imágenes con el programa Image J anteriormente mencionado.

## **8. Determinación de los parámetros neuroquímicos en tejido cerebral**

### **8.1 Determinación de niveles cerebrales de monoaminas y sus metabolitos.**

#### **8.1.1 Extracción y homogenización de las muestras**

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y decapitación. Se extrajo el cerebro y se diseccionó sobre hielo picado para obtener el estriado. Las estructuras cerebrales extraídas se congelaron rápidamente sobre hielo seco y se guardaron a -80 °C hasta el día del ensayo. Las muestras se pesaron en una balanza de precisión (Electronic Balance BP61S, Sartorius, Alemania). El tejido de ratón fue homogeneizado durante 10 segundos utilizando un homogeneizador de ultrasonidos (Labsonic 2000U, B. Braun Melsungen AG, Alemania) en 500 µl de una solución 0.2 M de ácido perclórico conteniendo cisteína al 0.1 %, metabisulfito sódico al 0.1 % y EDTA al 0.01 %. El homogeneizado se centrifugó a 12000 x g (Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, DuPont Instruments, Giralte, EE.UU.) durante 20 minutos a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante fue decantado y congelado a -40 °C hasta su posterior análisis.

#### **8.1.2 Cuantificación de la concentración de monoaminas y metabolitos**

La cuantificación de la concentración de DA, DOPAC y HVA, se realizó mediante un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (h.p.l.c.) con detección coulombimétrica. El sistema de h.p.l.c. utilizado incluyó una bomba (Waters 510) conectada a un inyector automático con refrigeración (capacidad máxima de inyección = 200 µl, Waters 712 WISP), una columna de fase reversa (Spherisorb ODS2; 5µm; 150 x 4.6mm; Waters) con precolumna (Nova-Pak C18, Waters) y un detector coulombimétrico (Coulchem (III), ESA, EE.UU) conectado a una unidad de integración (Unipoint, Gilson).

La fase móvil estuvo compuesta por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.05 M), ácido octanosulfónico (1 mM), EDTA (0.1 mM) y metanol 16 % en agua MilliQ ajustada a pH 3.7 (654 pH Meter, Metrohm, Suiza) con ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). La fase móvil fue filtrada (filtros de Nylon, diámetro 47 mm, tamaño del poro = 0.22  $\mu\text{m}$ , Waters) y desgasificada con helio. El flujo utilizado fue de 1.0 ml/min, el potencial del electrodo de trabajo fue +0.4 V y la sensibilidad de 1  $\mu\text{A}$ .

Las soluciones estándar utilizadas para la identificación y cuantificación de las áreas fueron DA, DOPAC y HVA. Estos estándares se prepararon a partir de soluciones madre de 1 mg/ml en la mezcla de ácido perclórico anteriormente descrita. La solución final contenía 50 ng/ml de DOPAC, 100 ng/ml de HVA y 250 ng/ml de DA en ácido perclórico. La concentración de DA, DOPAC y HVA se expresó en ng/g de tejido.

## 8.2 Determinación de los lugares de recaptación de DA

La cuantificación de la densidad de los lugares de recaptación de DA (DAT) fue llevada a cabo mediante una modificación del método descrito por Segal y colaboradores (Segal et al., 2003).

### 8.2.1 Extracción y homogenización de las muestras

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y decapitación. Se extrajo el cerebro y se diseccionó sobre hielo picado para obtener el estriado. Las estructuras cerebrales extraídas se congelaron rápidamente sobre hielo seco y se guardaron a -80 °C hasta el día del ensayo. Las muestras se pesaron en una balanza de precisión (Electronic Balance BP61S, Sartorius, Alemania) y se homogeneizaron durante 10 segundos utilizando un homogeneizador de ultrasonidos (Labsonic 2000U, B. Braun Melsungen AG, Alemania) en 750  $\mu\text{l}$  de una solución tampón de fosfato sódico 20mM conteniendo sacarosa 0.32 M. El homogeneizado se centrifugó a 30.000 x g durante 15 min a una temperatura de 4 °C (Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, DuPont Instruments, Giralt, EE.UU.). El sobrenadante se desechó y este proceso se repitió dos veces más. El precipitado final se resuspendió en 80 volúmenes de la solución de tampón fosfato-sacarosa. En esta solución final se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

### 8.2.2 Fijación de [ $^3\text{H}$ ]-WIN 35,428

Alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  (60  $\mu\text{g}$  de proteína aproximadamente) de esta suspensión de membranas se llevaron a tubos que contenían [3H]-WIN 35,428 nM (actividad específica de 87 Ci/mmol), desipramina 300 nM y tampón fosfato-sacarosa hasta un volumen de reacción de 500 $\mu\text{l}$ , en ausencia

y en presencia de cocaína 30  $\mu$ M, para la determinación de la unión total de o inespecífica, respectivamente.

Las muestras fueron incubadas durante 90 min a 4 °C. A continuación se filtraron a través de filtros (Whatman GF/B Skatron) pretratados con polietilenimina 0.1 %, utilizando un Semiautomatic Cell Harvester Skatron, Noruega. Una vez secos los filtros fueron transferidos a viales en los que se añadieron 2 ml de líquido de centelleo (Emulsifier-Safe, Packard Instruments BV, Holanda) y se conservaron toda la noche en oscuridad. Usándose como estándares tubos que contenían 50  $\mu$ l de [3H]-WIN 35,428 (50 nM) y 2 ml de líquido de centelleo. La radioactividad fue medida al día siguiente mediante espectrometría de centelleo (Tricarb Liquid Scintillation Analyzer, Model 2500, Packard Instrument Company). La fijación total e inespecífica se realizó por triplicado y se expresó en fmol de [3H]-WIN 35,428 unido por mg de proteína.

## 9. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los experimentos se analizaron mediante la t de Student cuando se compararon dos grupos. Si la comparación se realizó entre 3 o más grupos, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Newman-Keuls cuando se obtuvo un valor de F significativo, usando programa de análisis de datos GraphPad Prism<sup>®</sup> (Graph Pad Software versión 5, San Diego, EE.UU.)

El análisis estadístico de las medidas de temperatura rectal se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías utilizando el paquete informático de estadística BMDP/386 Dynamic (BMDP<sup>®</sup> Statistical Solutions, Cork, Eire) programa 2V cuando el número de observaciones fue igual en todos los grupos o programa 5V cuando el número de datos fue distinto. Se asignó el tratamiento como factor entre sujetos y el tiempo como medida repetida. El análisis estadístico de las presiones arteriales se realizó de igual manera.

## 10. Procedencia de compuestos utilizados

### Herramientas farmacológicas:

(+) **Metanfetamina**. Sigma Chemical (ref M8750 ).

**Batimastat (BB-94)**. Tocris/biogen (ref. 2961)

**Insolution™ JNK inhibitor II (SP600125)**. Calbiochem (Merk Millipore) (ref. 420128)

### Otros compuestos:

#### Sigma-Aldrich Química (España)

Clorhidrato de 3,4-dihidroxifeniletamina (dopamina, DA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético (ácido homovanílico; HVA), ácido ortofosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), ácido 1-octanosulfónico (sal sódica;  $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{O}_3\text{SNa}$ ), seroalbumina bovina, dimetilsulfóxido (DMSO,  $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ ), fosfato de sodio hidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), fosfato disódico dihidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), L-cisteína, polietilenimina, reactivo Folin (Folin & Ciocalteu's phenol reagent), dodecilsulfato sódico (SDS), Tris (hidroximetil) aminometano ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ , Trizma®), inhibidores de proteasas (p8340) y de fosfatasas (p5726), cloruro de zin ( $\text{ZnCl}_2$ ).

#### Merk Millipore (Alemania)

Metanol para h.p.l.c ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), metabisulfito sódico ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ), fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), tartrato sódico dihidratado ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), sal disódica dihidratada del ácido etilendiaminotetracético (Tritiplex® III; EDTA).

#### Panreac (España)

Ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ ), ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ), cloruro potásico ( $\text{KCl}$ ), cloruro cálcico dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), cloruro magnésico hexahidratado ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), cloruro sódico ( $\text{NaCl}$ ), hidróxido sódico ( $\text{NaOH}$ ), sulfato cúprico dihidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).

#### Perkin Elmer Boston MA (USA)

$[\text{}^3\text{H}]$ -WIN 35,428, Líquido de centelleo Emulsier-Safe.

#### Bio-Rad (España)

SDS 10%, glicina, azul de bromofenol, persulfato amónico, monooleato de polioxietilenosorbitan (Tween 20), N-N'-N'-tetrametiletlenodiamina (TEMED), acrilamida, Triton® X-100, DC™ protein assay.

#### Invitrogen (España)

ProLong® Gold, EnzCheck® *gelatinase assay kit*.

#### Roche (España)

Nonidet P40.

# RESULTADOS

## 1. Cambios inducidos por metanfetamina en la BHE

### 1.1 Efecto de metanfetamina sobre la actividad y expresión de MMP-9 y MMP-2 en el estriado de ratón

Los enzimas con actividad gelatinasa han sido involucrados en gran variedad de procesos celulares como en proliferación celular, angiogénesis, plasticidad neuronal, o la ruptura o modificación de la barrera hematoencefálica (Asahi et al., 2001).

En este estudio se han cuantificado las actividades de los dos principales enzimas gelatinasas, MMP-2 o gelatinasa A y MMP-9 o gelatinasa B, 1, 3 y 24 h tras la última administración de metanfetamina mediante zimografía en gel.

El análisis cuantitativo de las zimografías mediante ANOVA de una vía revela que metanfetamina induce un aumento en la actividad de la forma activa de MMP-9 (97 kDa) ( $F_{3,25} = 18.79$ ,  $p < 0.0001$ ) 1 h después de su administración ( $2.16 \pm 0.54$  u.a. vs.  $8.64 \pm 0.84$  u.a.). No se observó ningún cambio 3 y 24 h después en comparación con los animales tratados con salino ( $3.92 \pm 0.57$  u.a. y  $2.60 \pm 0.30$  u.a., respectivamente) (figura 33).

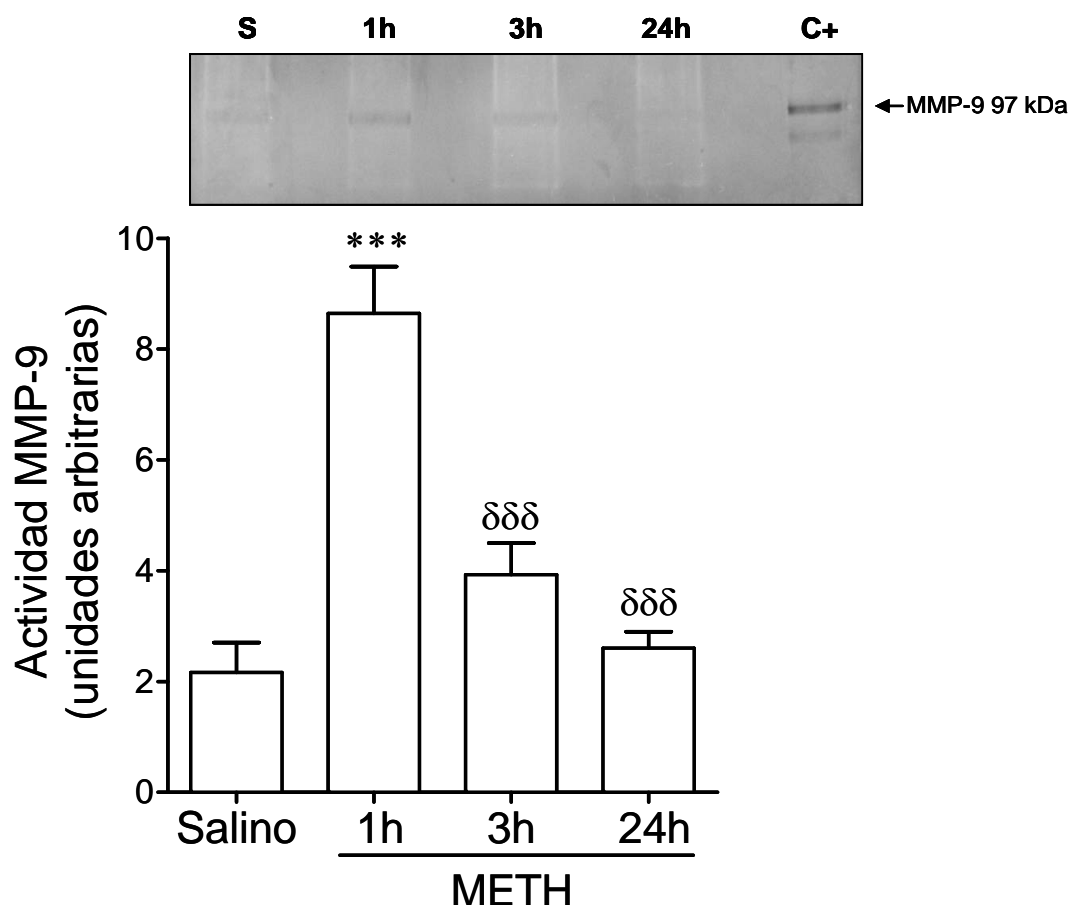


Figura 33. Efecto de metanfetamina (METH, 4 mg/kg, 3 veces, cada 3 h, i.p.) sobre la actividad estriatal de MMP-9. Los animales fueron sacrificados 1, 3 y 24 h tras la última inyección de la droga. La figura muestra una zimografía representativa de la curva temporal de la actividad de MMP-9 1, 3 y 24 h tras la administración de la droga. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  E.E.M. de la densidad óptica en unidades arbitrarias (n = 6-8). Diferente de Salino: \*\*\*p < 0.001. Diferente de METH 1 h:  $\delta\delta\delta$ p < 0.001.

Además de un aumento en la actividad de MMP-9, la administración de metanfetamina induce cambios en la expresión del enzima (F3,20 = 11.52, p < 0.0001). El test post hoc revela que 1 h después de su administración, incrementa la expresión de esta proteína medida por Western blot respecto al grupo salino (100  $\pm$  3.28 % vs. 122.9  $\pm$  8.99 %). A las 3 h de la administración de la droga no se observa ningún efecto significativo (112.2  $\pm$  5.39 %). Sin embargo, 24 h tras la inyección de metanfetamina, la expresión de MMP-9 es menor que la observada en el estriado de ratones inyectados con salino (77.8  $\pm$  3.05 %) (figura 34).

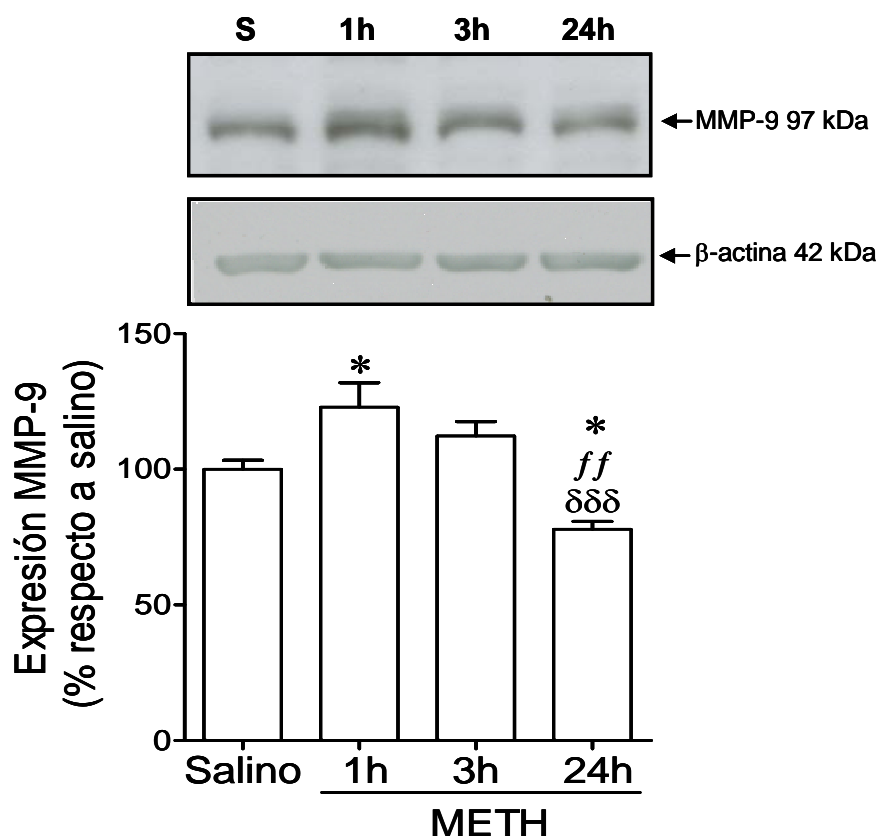


Figura 34. Efecto de metanfetamina (METH, 4 mg/kg, 3 veces, cada 3 h, i.p.) sobre la expresión estriatal de MMP-9. Los animales fueron sacrificados 1, 3 y 24 h tras la última inyección de la droga. La figura muestra un Western blot representativo de la curva temporal de la expresión de proteína MMP-9 1, 3 y 24 h tras la administración de la droga. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  E.E.M. de la expresión de la proteína normalizada por su  $\beta$ -actina y en porcentaje respecto a la media del grupo salino (n = 6). Diferente de Salino: \*p < 0.05. Diferente de METH 1 h:  $\delta\delta\delta$ p < 0.001. Diferente de METH 3 h:  $ff$ p < 0.01.

Metanfetamina no alteró la actividad gelatinasa de MMP-2 según el ANOVA de una vía en el estriado a ninguno de los tiempos estudiados ( $F_{3,22} = 0.46$ ,  $p = 0.71$ ) (figura 35a), manteniéndose la actividad en valores similares a los observados en animales inyectados con salino ( $4.70 \pm 0.32$  u.a. vs.  $4.49 \pm 0.36$  u.a.,  $4.72 \pm 0.46$  u.a. y  $4.04 \pm 0.59$  u.a. para salino, METH 1, 3 y 24 h respectivamente ). Como se muestra en la figura 35b, tampoco se observaron cambios en su expresión ( $100 \pm 5.32$  % vs.  $113.3 \pm 22.08$  %,  $117.6 \pm 15.94$  % y  $110.6 \pm 9.45$  % para salino, METH 1, 3 y 24 h respectivamente) ( $F_{3,19} = 0.23$ ,  $p = 0.88$ ).

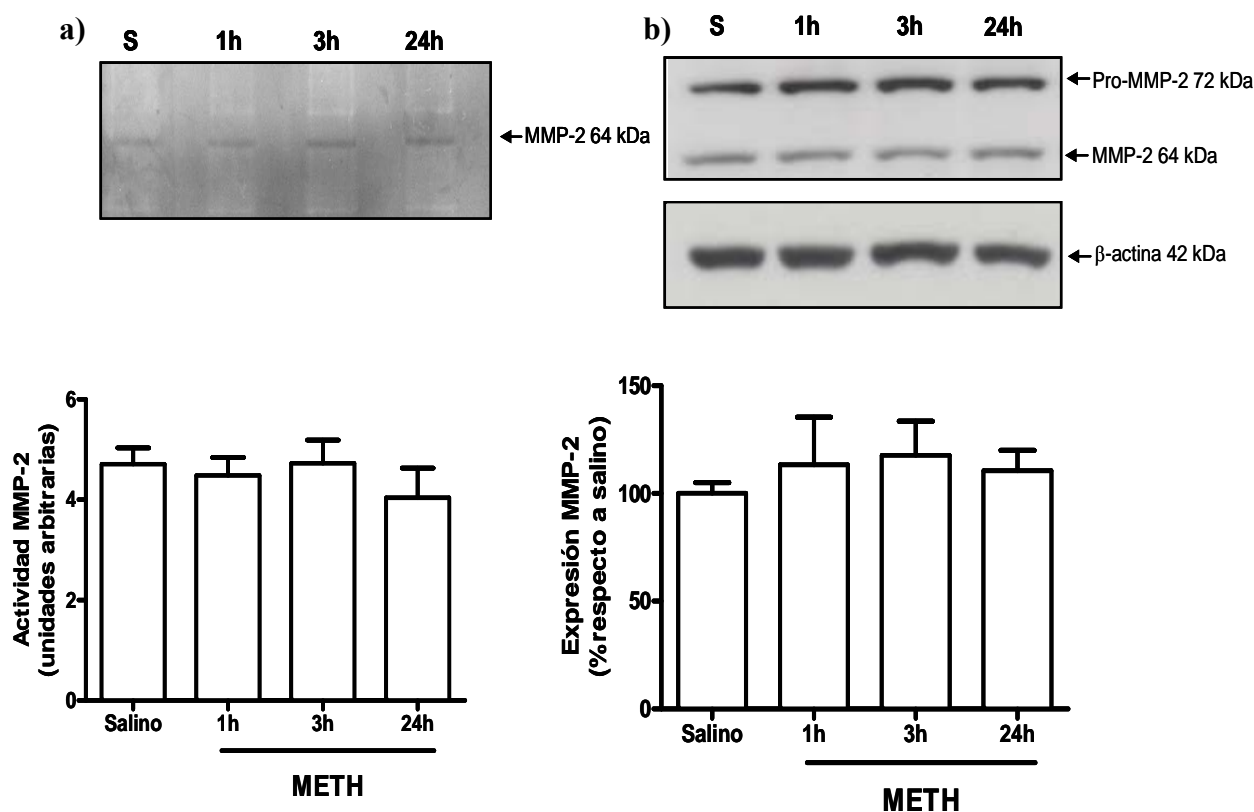


Figura 35. Efecto de metanfetamina (METH, 4 mg/kg, 3 veces, cada 3 h, i.p.) sobre la actividad (a) y expresión (b) de MMP-2 en estriado. Los animales fueron sacrificados 1, 3 y 24 h tras la última inyección de la droga. En la figura (a) se observa una zimografía representativa de la curva temporal de la actividad de MMP-2 1, 3 y 24 h tras la administración de la droga. Los resultados se muestran como media  $\pm$  E.E.M. de la densidad óptica en unidades arbitrarias ( $n = 7-5$ ). La figura (b) muestra un Western blot representativo de la expresión de las formas pro- y activa de MMP-2. Los resultados en la expresión de la forma activa de MMP-2 (64 kDa) se muestran como la media  $\pm$  E.E.M. de la expresión de la proteína normalizada por su  $\beta$ -actina y en porcentaje respecto a la media del grupo salino ( $n = 6$ ).



## 1.2 Efecto de metanfetamina sobre la expresión de laminina en estriado de ratón

Dado el aumento de la actividad enzimática de MMP-9, y ya que uno de sus substratos es la laminina (Gu Z et al Journal of neuroscience 2005), hemos analizado su expresión por Western blot. En concordancia con el incremento en la actividad de la actividad gelatinasa de MMP-9, el ANOVA de una vía revela que la metanfetamina induce un descenso en la expresión estriatal de laminina respecto a la observada en animales inyectados con salino ( $F_{3,17} = 4.12$ ;  $p = 0.0228$ ), y que se produce 1 h después de la administración de metanfetamina ( $100 \pm 10.05\%$  vs.  $57.2 \pm 8.57\%$ ). No se observó ningún efecto 3 h y 24 h después de la administración de la droga ( $96.2 \pm 9.50\%$  y  $84.2 \pm 10.24\%$  respectivamente) con respecto a los animales control (figura 36).

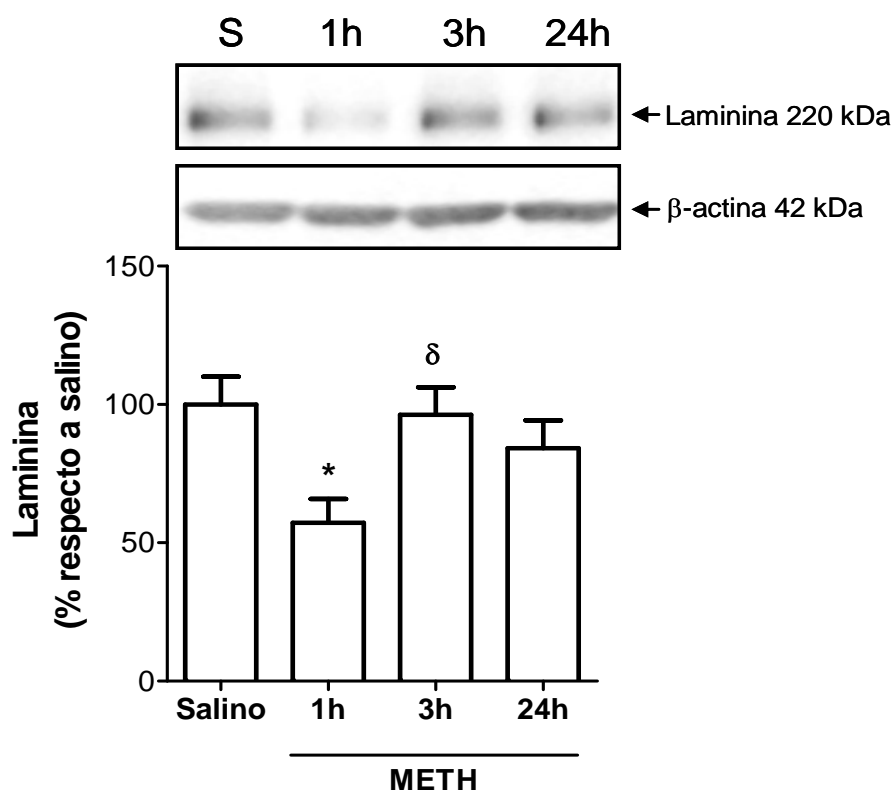


Figura 36. Efecto de metanfetamina (METH, 4 mg/kg, 3 veces, cada 3 h, i.p.) sobre la expresión de laminina. Los animales fueron sacrificados 1, 3 y 24 h tras la última inyección de la droga. La figura muestra un Western blot representativo de la expresión de laminina. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  E.E.M. de la expresión de la proteína normalizada por su  $\beta$ -actina y en porcentaje respecto a la media del salino ( $n = 5-6$ ). Diferente de Salino: \* $p < 0.05$ . Diferente de METH 1 h:  $\delta p < 0.05$ .

### **1.3 Efecto de metanfetamina sobre la extravasación de inmunoglobulina G en el estriado de ratón**

Una de los rasgos más característicos del cerebro es que está separado de la sangre por la barrera hematoencefálica, que regula el paso de nutrientes y sustancias e impide el paso de toxinas al parénquima cerebral.

Uno de los marcadores de la ruptura o del aumento de permeabilidad de la barrera hematoencefálica es la aparición de proteína endógena inmunoglobulina G (IgG) en el parénquima cerebral.

El ANOVA de una vía revela que la administración de metanfetamina induce un aumento significativo en la inmunoreactividad de IgG en el estriado del ratón ( $F_{3,13} = 5.71$ ,  $p = 0.0102$ ), que se hace evidente 1 h después de la última inyección de metanfetamina con respecto a la observada en los animales tratados con salino ( $100 \pm 9.98\%$  vs.  $186.5 \pm 23.99\%$ ). Este marcaje es máximo a las 3 h de la administración de la droga ( $100 \pm 9.98\%$  vs.  $248.1 \pm 56.18\%$ ) y se mantiene elevado respecto a los animales salino incluso 24 h después ( $100 \pm 9.98\%$  vs.  $216.3 \pm 26.34\%$ ) (figura 37).

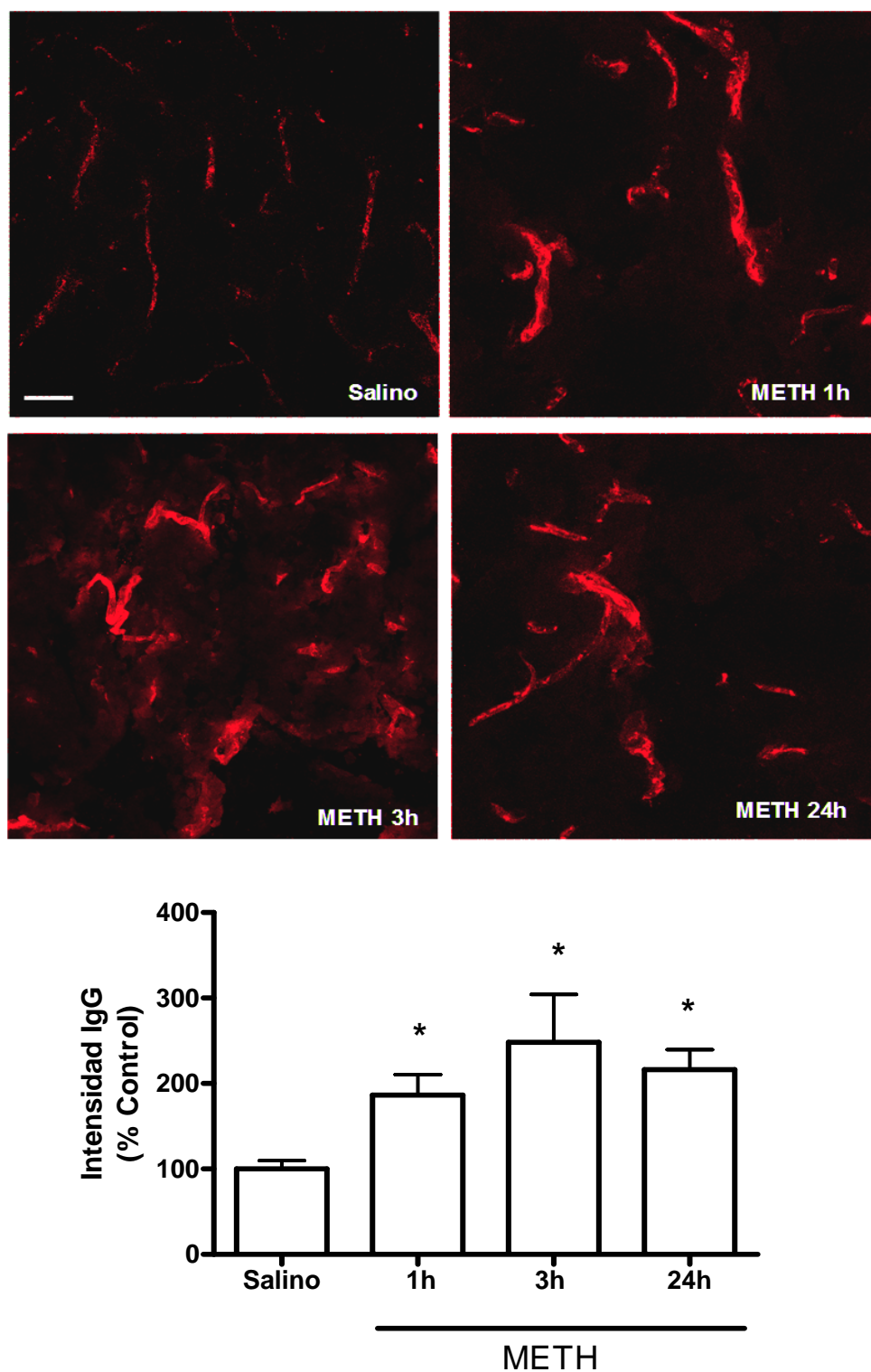
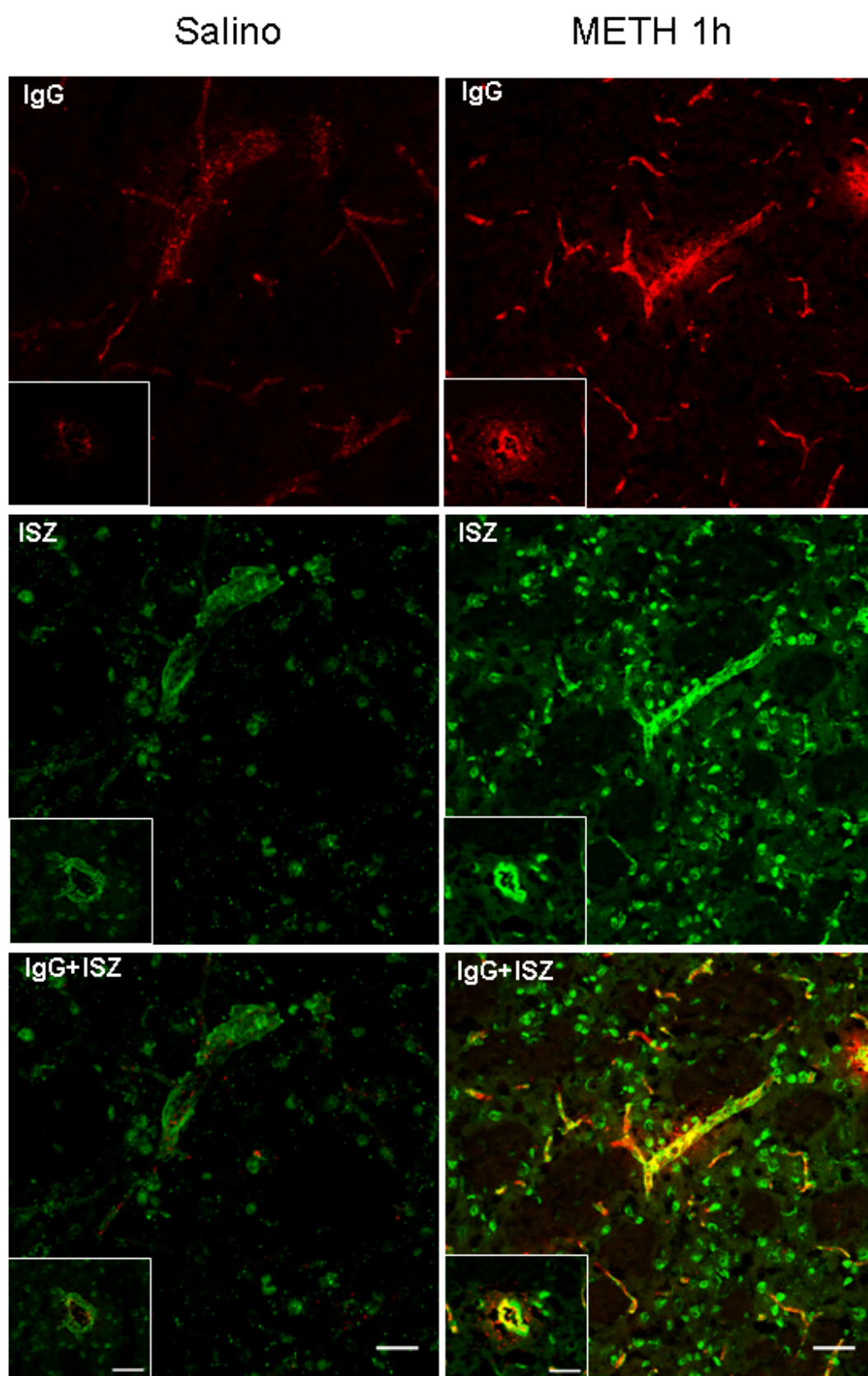


Figura 37. Efecto de metanfetamina (METH, 4 mg/kg, 3 veces, cada 3 h, i.p.) sobre la extravasación de IgG. Los animales fueron sacrificados 1, 3 y 24 h tras la última inyección de la droga. La figura muestra imágenes de inmunofluorescencia (40x) representativas del aumento en la extravasación de IgG endógena a diferentes tiempos tras la administración de la droga. La barra equivale a 100  $\mu$ m. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.E.M. de la intensidad integrada de fluorescencia en porcentaje respecto a la media del grupo salino (n = 4-5). Diferente de Salino: \*p < 0.05.

La zimografía *in situ* (ISZ) muestra la actividad MMP alrededor de los vasos sanguíneos y en diferentes células del estriado del ratón. La t de Student muestra que 1 h tras la administración de metanfetamina se produce un incremento en la actividad gelatinasa global en el estriado de ratón ( $100 \pm 8.71 \%$  vs.  $128.4 \pm 6.88 \%$ ) ( $p < 0.05$ ). Este incremento se observa tanto en vasos longitudinales y transversales como en diferentes células del parénquima cerebral. En la figura 38 observamos como la actividad gelatinasa colocaliza con la extravasación de IgG 1 h tras la administración de la droga (pero no en los animales tratados con salino), correlacionando la extravasación con el aumento en la actividad gelatinasa.



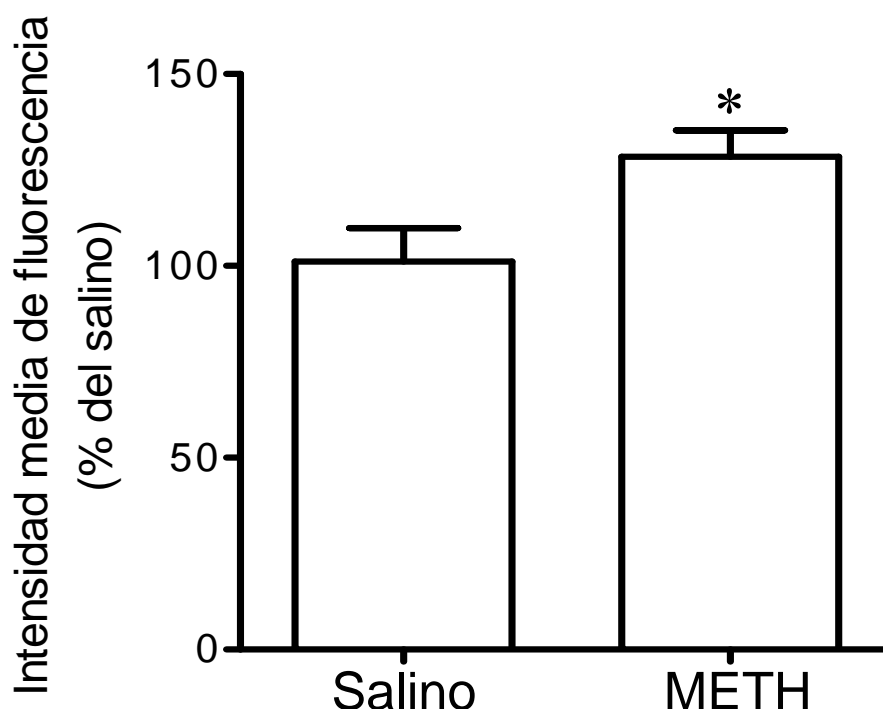


Figura 38. Efecto de metanfetamina (METH, 4 mg/kg, 3 veces, cada 3 h, i.p.) sobre la actividad gelatinasa *in situ* en el estriado del ratón. Los animales fueron sacrificados 1 h tras la última inyección de la droga. La figura muestra imágenes representativas (40x) de la extravasación de IgG endógena y zimografía *in situ* 1 h tras la administración de metanfetamina. El inserto muestra vasos transversales. En los paneles inferiores podemos observar la colocalización entre la IgG extravasada y la actividad gelatinasa. La barra equivale a 100  $\mu$ m. Los resultados se expresan como a media  $\pm$  E.E.M. de la intensidad media de fluorescencia en porcentaje respecto a la media de los animales control (n= 5-6). Diferente de Salino: \*p < 0.05.

#### 1.4 Efecto de metanfetamina sobre la expresión de JNK1/2 en el estriado de ratón

La administración de metanfetamina (4 mg/kg, 3 veces, cada 3 h, i.p.) induce una respuesta de estrés en el estriado del ratón que se traduce en un aumento en la fosforilación de JNK1/2 ( $F_{3,25} = 11.02$ ,  $p < 0.0001$ ) 1 y 3 h tras la última inyección de la droga respecto a los animales inyectados con salino ( $100 \pm 5.04$  % vs.  $154.5 \pm 13.11$  % y  $186.2 \pm 15.87$  %) (figura 39). Este efecto desaparece a las 24 h tras la administración de la droga ( $108.9 \pm 6.97$  %). Metanfetamina no altera la expresión estriatal de JNK1/2 total en ninguno de los tiempos estudiados.

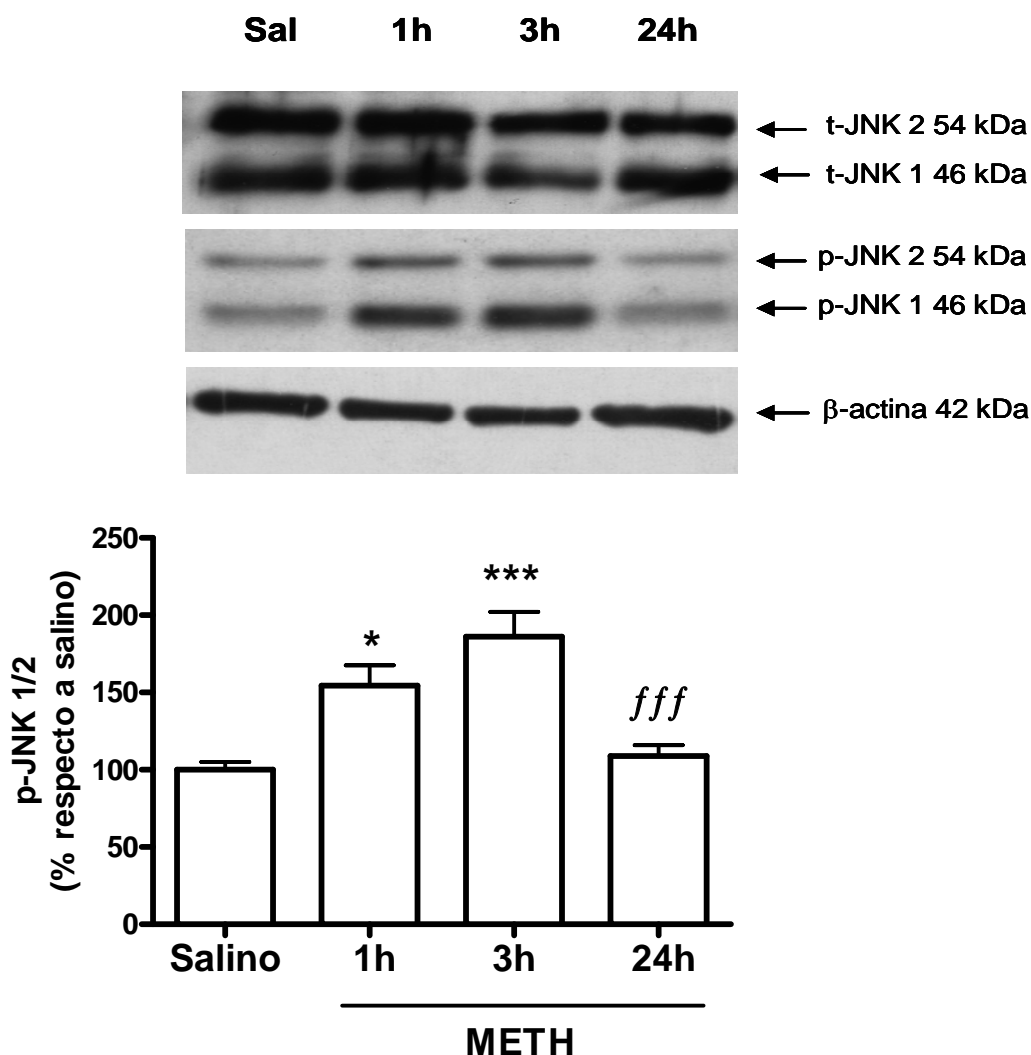


Figura 39. Efecto de metanfetamina (METH, 4 mg/kg, 3 veces, cada 3 h, i.p.) sobre la expresión estriatal de la forma total y fosforilada de JNK1/2. Los animales fueron sacrificados 1, 3 y 24 h tras la última inyección de la droga. La figura muestra un Western blot representativo de la expresión de p-JNK1/2. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  E.E.M. de la expresión de la proteínas fosforiladas normalizada por la total y por su  $\beta$ -actina y en porcentaje respecto a la media del grupo salino ( $n = 6-8$ ). Diferente de Salino: \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Diferente de METH 3 h: *fff*  $p < 0.001$ .

## 2. Efectos de la inhibición de JNK1/2 sobre los cambios en la BHE inducidos por metanfetamina

Puesto que metanfetamina induce una respuesta de estrés en el estriado de ratón mediada en parte por la activación de la vía JNK1/2 y el estrés es una de las causas de la disfunción de la BHE, hemos analizado la implicación de JNK1/2 sobre los efectos inducidos por metanfetamina en la BHE.

## 2.1 Efecto de SP600125 sobre la fosforilación de JNK1/2 inducida por metanfetamina

Como se observa en la figura 40 la administración del inhibidor selectivo de JNK1/2 SP600125 (30 mg/kg i.p) previene el incremento de la fosforilación de JNK1/2 inducido por metanfetamina 1 h tras la última inyección de la droga ( $136.0 \pm 19.79\%$  vs.  $83.4 \pm 10.48\%$ ). No ejerció ningún efecto sobre la fosforilación de JNK1/2 en animales tratados con salino.

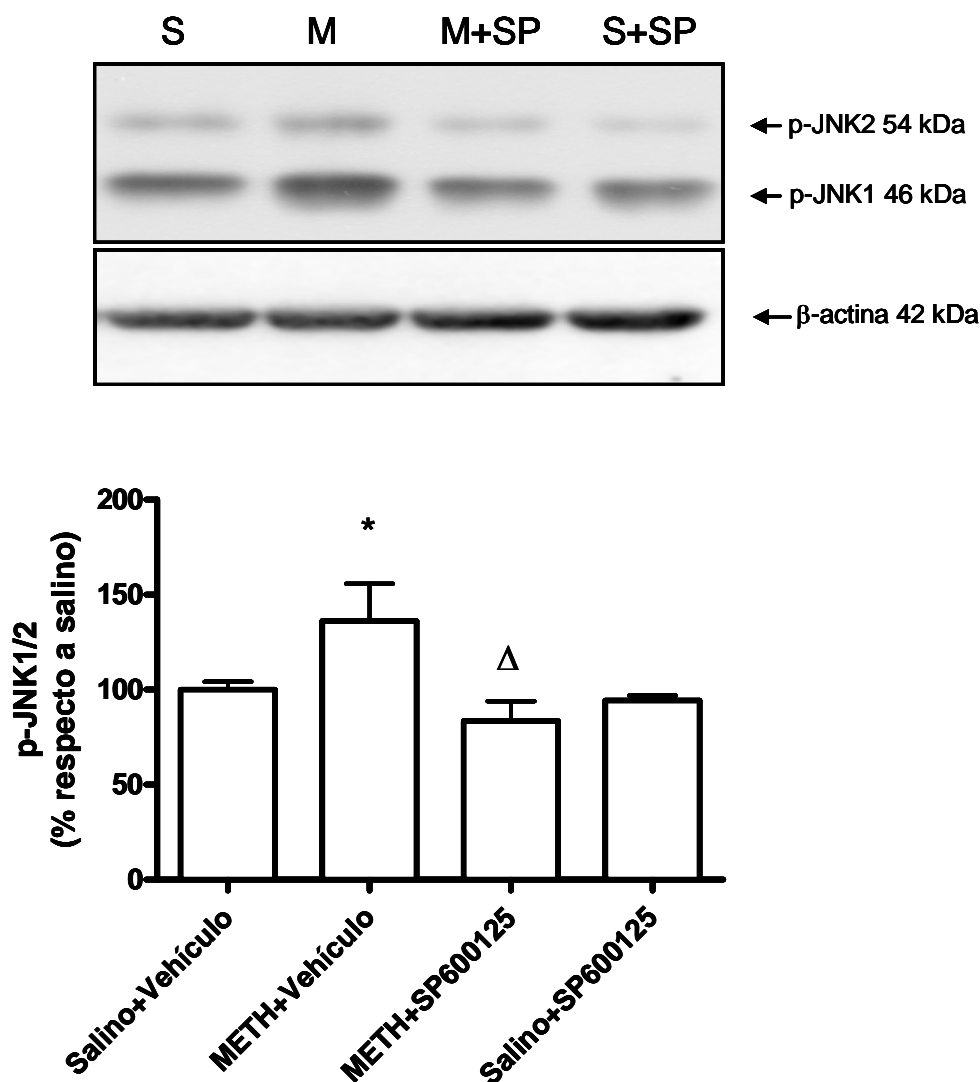
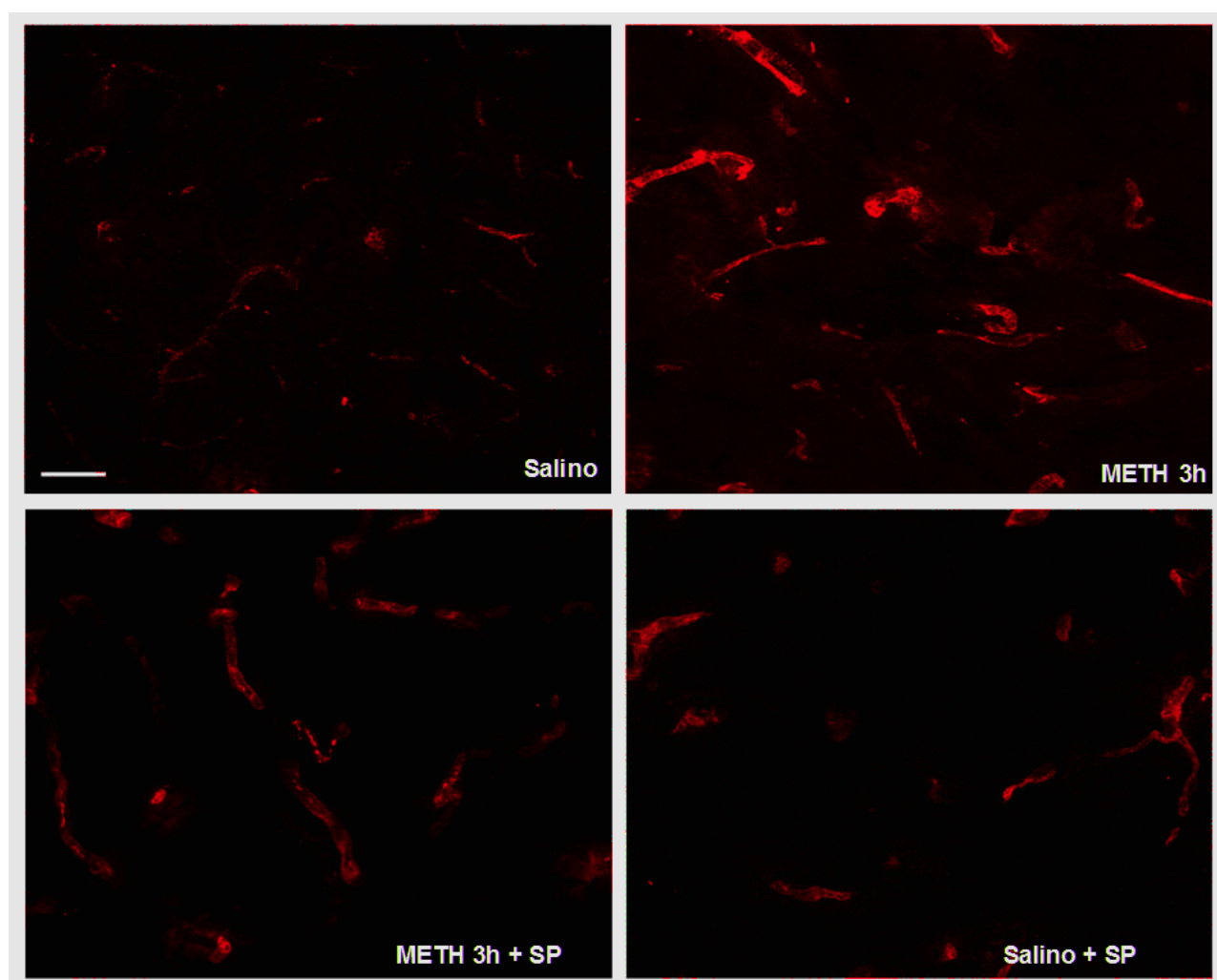


Figura 40. Efecto de SP600125 (SP, 30 mg/kg i.p) sobre los cambios inducidos por metanfetamina (METH, 4 mg/kg, 3 veces, cada 3 h, i.p) en la fosforilación de JNK1/2. Los animales fueron sacrificados 1 h tras la última inyección de la droga. La figura muestra un Western blot representativo del efecto de SP600125 sobre la fosforilación de JNK1/2 inducido por metanfetamina. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  E.E.M. de la expresión de la proteínas fosforiladas JNK1/2 normalizada por su  $\beta$ -actina y en porcentaje respecto a la media del grupo salino ( $n = 5-6$ ). Diferente de Salino+Vehículo: \* $p < 0.05$ . Diferente de METH+Vehículo  $^{\Delta}p < 0.05$ .



## 2.2 Efecto de SP600125 sobre la extravasación de IgG al parénquima cerebral

El ANOVA de una vía revela un efecto significativo del tratamiento con metanfetamina y SP600125 ( $F_{3,17} = 49.88$ ,  $P < 0.0001$ ). El test post hoc muestra que en los animales tratados con metanfetamina se produce una extravasación de IgG con respecto a los animales control ( $100 \pm 7.21$  % vs.  $210.0 \pm 11.14$  %) y que este efecto es abolido cuando se administra a los animales el inhibidor de JNK1/2 SP600125 ( $100 \pm 7.21$  % vs.  $98.4 \pm 2.96$  %) (figura 41). El inhibidor de JNK1/2 no tiene efecto ( $100 \pm 7.21$  % vs.  $81.4 \pm 9.17$  %) en animales inyectados con salino.



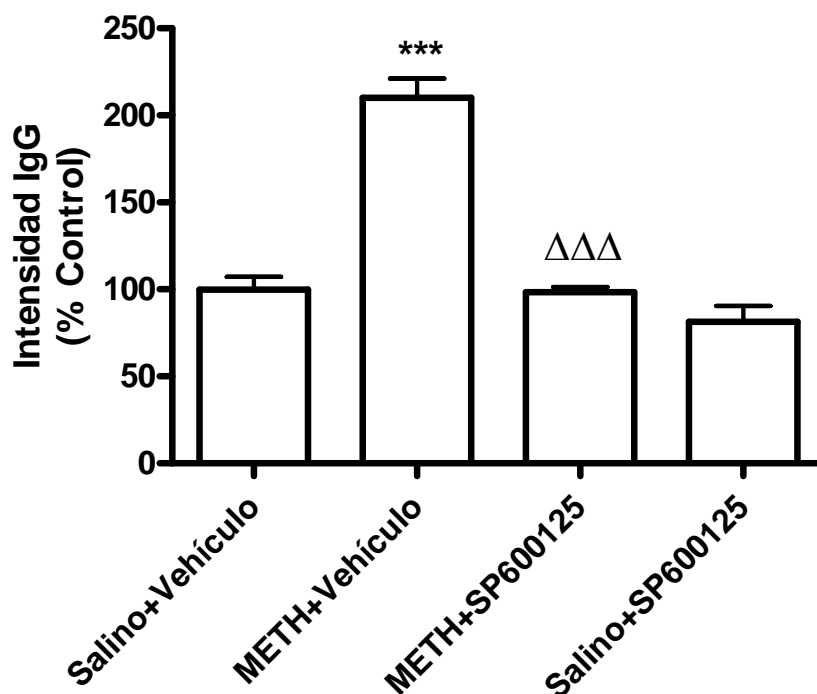


Figura 41. Efecto SP600125 (SP, 30 mg/kg i.p) sobre la extravasación de IgG inducida por metanfetamina (METH, 4 mg/kg, 3 veces, cada 3 h, i.p). Los animales fueron sacrificados 3 h tras la última inyección de la droga. La figura muestra imágenes de fluorescencia representativas (40x). La barra equivale a 100  $\mu$ m. Los datos se muestran como la media  $\pm$  E.E.M. de la intensidad integrada de fluorescencia en porcentaje respecto a la media del grupo control (n = 4-7). Diferente de Salino+Vehículo: \*\*\*p < 0.001. Diferente de METH+Vehículo:  $\Delta\Delta\Delta$ p < 0.001.

### 2.3 Efecto de SP600125 sobre la activación de MMP-9 inducida por metanfetamina

Incrementos en la actividad de MMP-9 se relacionan con aumentos en la extravasación de IgG. Puesto que la administración de SP600125 inhibe la extravasación de IgG inducida por metanfetamina, hemos analizado el efecto del inhibidor de JNK1/2 sobre la actividad de MMP-9. El ANOVA de una vía revela un efecto significativo del tratamiento ( $F_{3,18} = 4.19$ ,  $p = 0.0205$ ). El test post hoc revela que SP600125 (30 mg/kg) inhibe el incremento en la actividad de MMP-9 inducido por metanfetamina ( $3.94 \pm 0.79$  u.a. vs.  $1.55 \pm 0.47$  u.a.). La administración del compuesto por si mismo no tiene un efecto significativo en la actividad de MMP-9 en comparación con los animales control ( $1.59 \pm 0.47$  u.a. del control vs.  $1.82 \pm 0.30$  u.a. de SP600125) (figura 42).

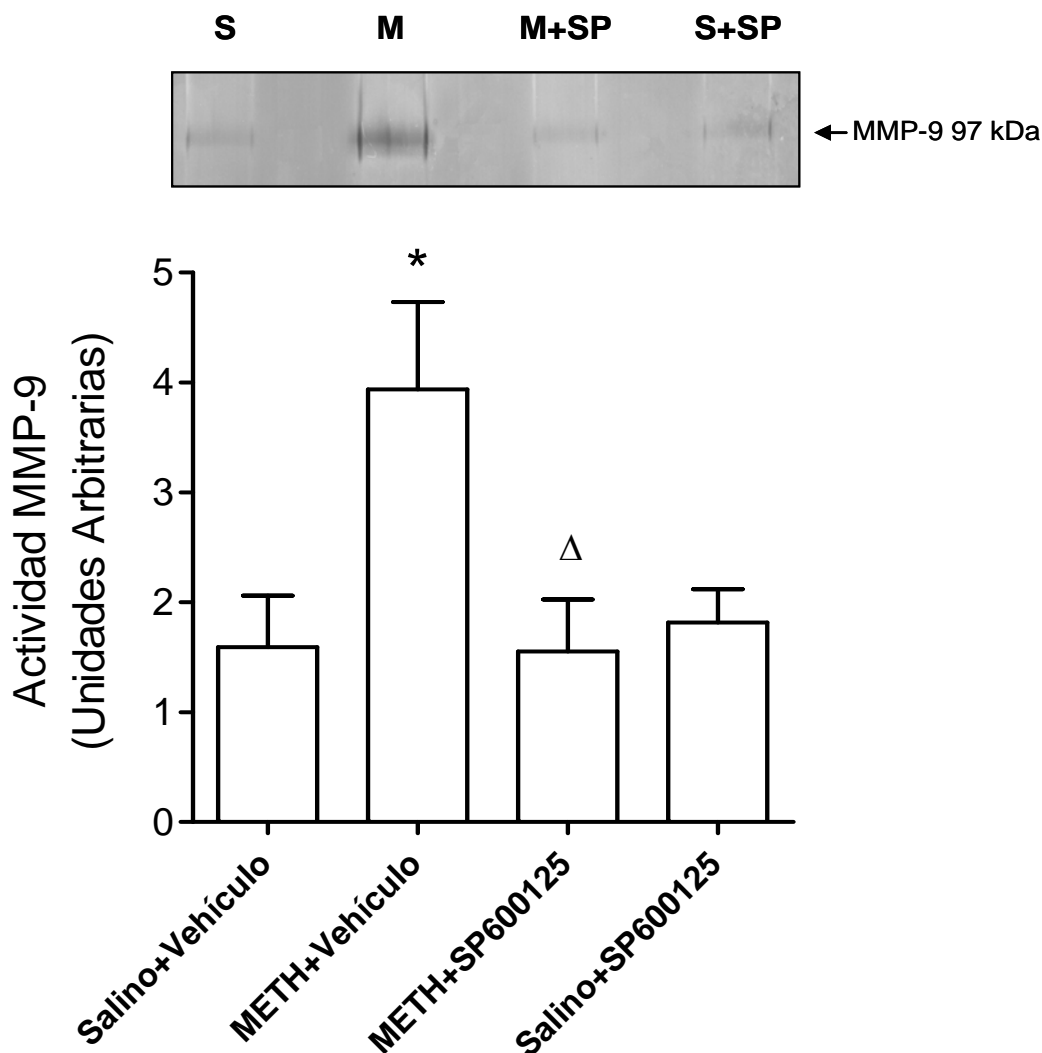


Figura 42. Efecto de SP600125 (SP, 30 mg/kg i.p) sobre los cambios inducidos por metanfetamina (METH, 4 mg/kg, 3 veces, cada 3 h, i.p) en la actividad de MMP-9. Los animales fueron sacrificados 1 h tras la última inyección de la droga. La figura muestra una zimografía en gel representativa de la actividad de MMP-9. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  E.E.M. de la densidad óptica en unidades arbitrarias (n = 5-6). Diferente de Salino+Vehículo: \*p < 0.05. Diferente de METH+Vehículo:  $\Delta$ p < 0.05.

#### 2.4 Efecto de SP600125 sobre la degradación de laminina inducida por metanfetamina

Como la activación de MMP-9 está relacionada con la degradación de laminina, hemos analizado la expresión de laminina en el estriado del ratón por Western blot para determinar el efecto que tiene la administración de SP600125 en la expresión de esta proteína. El ANOVA de una vía muestra un efecto significativo del tratamiento ( $F_{3,18} = 3.66$ ,  $p = 0.0322$ ). Consecuente con la inhibición de la actividad de MMP-9, la degradación de laminina inducida por metanfetamina 1 h tras la última

inyección de la droga se inhibe con SP600125 ( $57.24 \pm 8.57$  % vs.  $96.92 \pm 10.20$  %). La administración de SP600125 no modifica por sí misma la expresión de laminina respecto a la observada en animales control ( $92.91 \pm 11.98$  % vs.  $100 \pm 12.29$  % respectivamente) (figura 43).

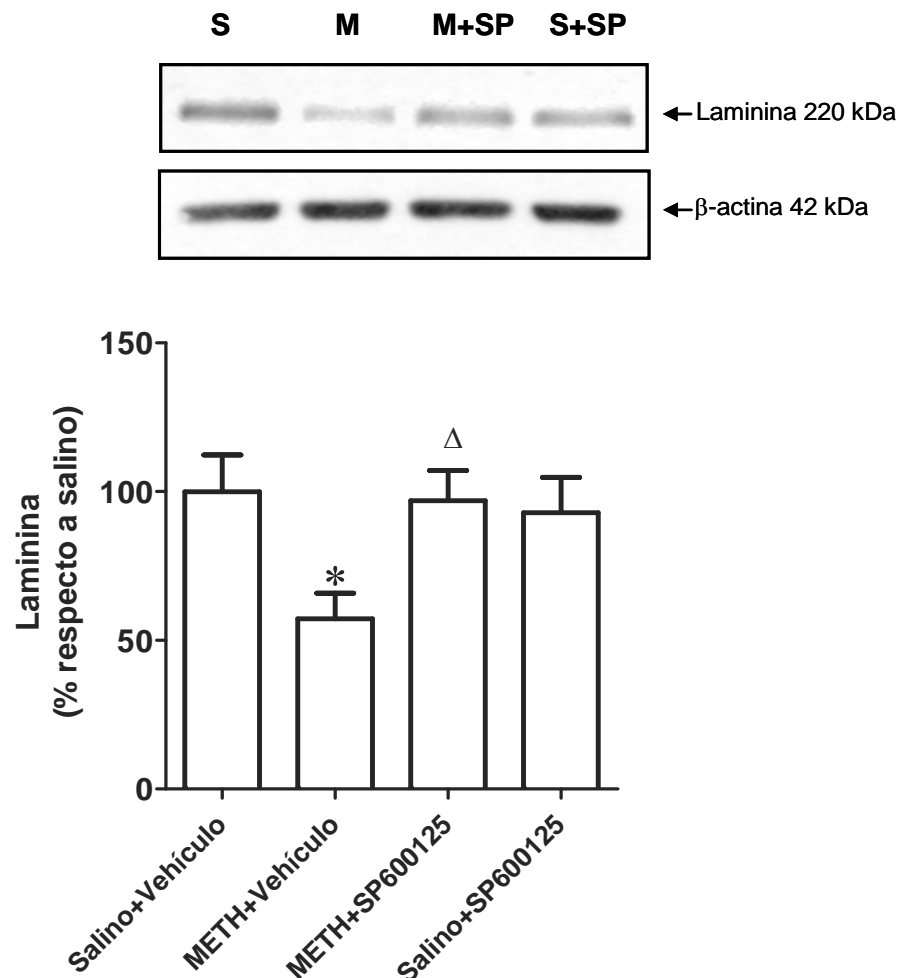


Figura 43. Efecto de SP600125 (SP, 30 mg/kg i.p) sobre los cambios inducidos por metanfetamina (METH, 4 mg/kg, 3 veces, cada 3 h, i.p) en la expresión de laminina. Los animales fueron sacrificados 1 h tras la última inyección de la droga. La figura muestra un Western blot representativo de la expresión de laminina. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  E.E.M. de la expresión de la proteína normalizada por su  $\beta$ -actina y en porcentaje respecto a la media del grupo salino ( $n = 4-6$ ). Diferente de Salino+Vehículo: \* $p < 0.05$ . Diferente de METH+Vehículo  $^{\Delta}p < 0.05$ .

## 2.5 Efecto de SP600125 sobre la hipertermia inducida por metanfetamina

Uno de los efectos más característicos de metanfetamina es la respuesta hipertérmica que aparece inmediatamente después de su administración. Para descartar que los efectos observados con el tratamiento con SP600125 se deban a una disminución de la hipertermia se monitorizó la

temperatura rectal de los animales durante todo el experimento. El ANOVA de dos vías muestra que hay un efecto significativo del tratamiento ( $F_{3,47} = 17,88$ ,  $p < 0.001$ ). El test post hoc revela que metanfetamina incrementa la temperatura rectal 30-60 minutos tras la inyección de la droga ( $F_{1,24} = 14,08$ ,  $p < 0.001$ ). SP600125, administrado previo a la última inyección de metanfetamina, no modifica esta respuesta hipertérmica ( $F_{1,27} = 0.007$ ,  $p = 0.98$ ), pese a que modifica la temperatura de los animales inyectados con salino ( $F_{1,20} = 10,17$ ,  $p < 0.001$ ) (figura 44).

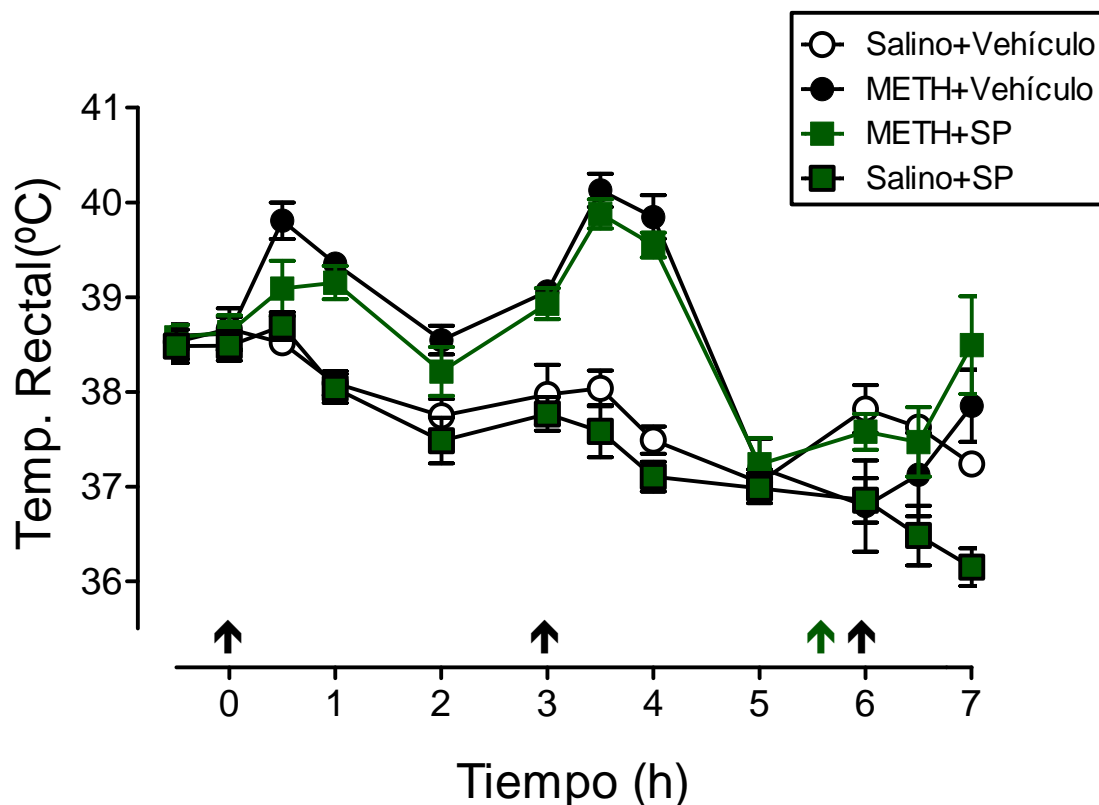


Figura 44. Efecto de SP600125 (SP, 30 mg/kg i.p) sobre los cambios inducidos por metanfetamina (METH, 4 mg/kg, 3 veces, cada 3 h, i.p) en la temperatura rectal de los ratones. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  E.E.M. de la temperatura rectal en  $^{\circ}\text{C}$  ( $n = 5-7$ ). Las flechas negras indican la administración de metanfetamina y la verde la de SP600125.

### 3. Efecto del inhibidor de MMPs Batimastat sobre la extravasación de IgG y la degradación de laminina inducida por metanfetamina

Puesto que la administración de metanfetamina induce un aumento de la extravasación de IgG así como un incremento en la actividad de MMP-9, hemos analizado la implicación directa de MMP-9 en la disminución en la expresión de laminina así como en la extravasación de IgG inducida por la

droga administrando el inhibidor de MMPs Batimastat (BB-94) (50 mg/kg). Con respecto a la laminina, el ANOVA de una vía revela un efecto significativo del tratamiento ( $F_{3,18} = 4,19$ ,  $p = 0.0205$ ). El test post hoc indica que BB-94 previene la degradación de laminina inducida por metanfetamina ( $107.1 \pm 12.48$  % vs.  $68.5 \pm 7.88$  %, respectivamente). La administración de BB-94 no altera la expresión de laminina respecto a los animales inyectados con salino ( $100.2 \pm 5.73$  % vs.  $100 \pm 1.08$  %, respectivamente) (figura 45).

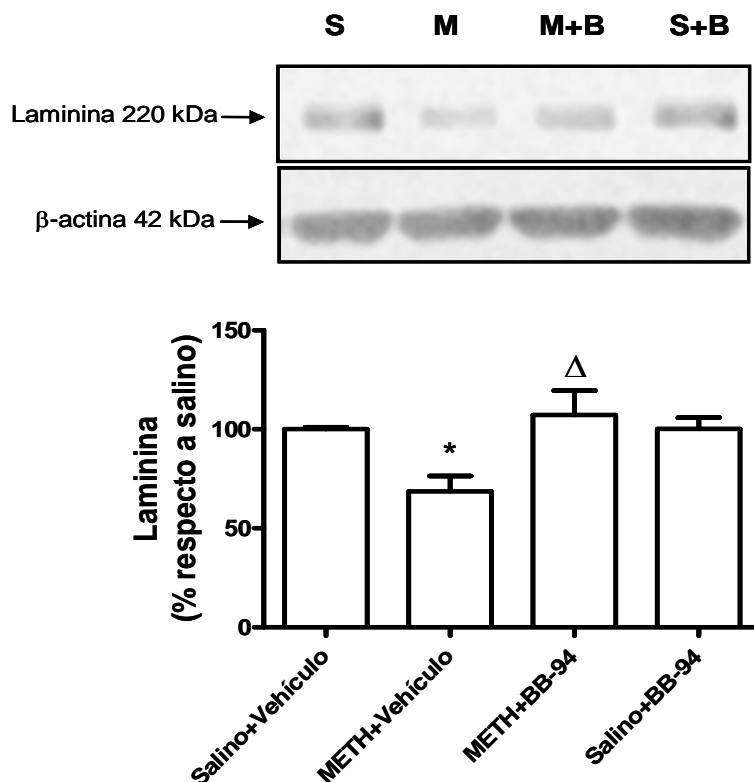


Figura 45. Efecto de BB94 (50 mg/kg, i.p) sobre los cambios inducidos por metanfetamina (METH, 4 mg/kg, 3 veces, cada 3 h, i.p) en la expresión de laminina. BB-94 se administró 30 minutos antes de la primera y última inyección de METH. Los animales fueron sacrificados 1 h tras la última inyección de la droga. La figura muestra un Western blot representativo de la expresión de laminina. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  E.E.M. de la expresión de la proteína normalizada por su  $\beta$ -actina y en porcentaje respecto a la media del grupo salino ( $n = 4-5$ ). Diferente de salino: \* $p < 0.05$ . Diferente de METH:  $\Delta p < 0.05$ .

La administración de BB-94 también produjo efectos sobre la extravasación de IgG inducida por metanfetamina. El ANOVA de una vía revela un efecto del tratamiento ( $F_{3,13} = 4.77$ ,  $P = 0.018$ ). El test post hoc indica que el tratamiento con BB-94 inhibe la extravasación de IgG inducida por metanfetamina 1 h después de la última administración de la droga ( $116.2 \pm 13.71$  % vs.  $195.2 \pm$

24.86 % respectivamente). No se observó ningún efecto cuando se administró BB-94 únicamente (figura 46).

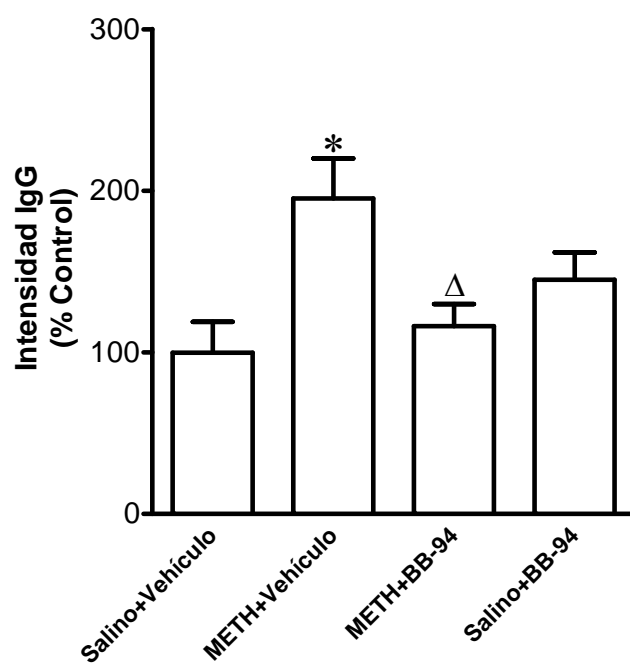
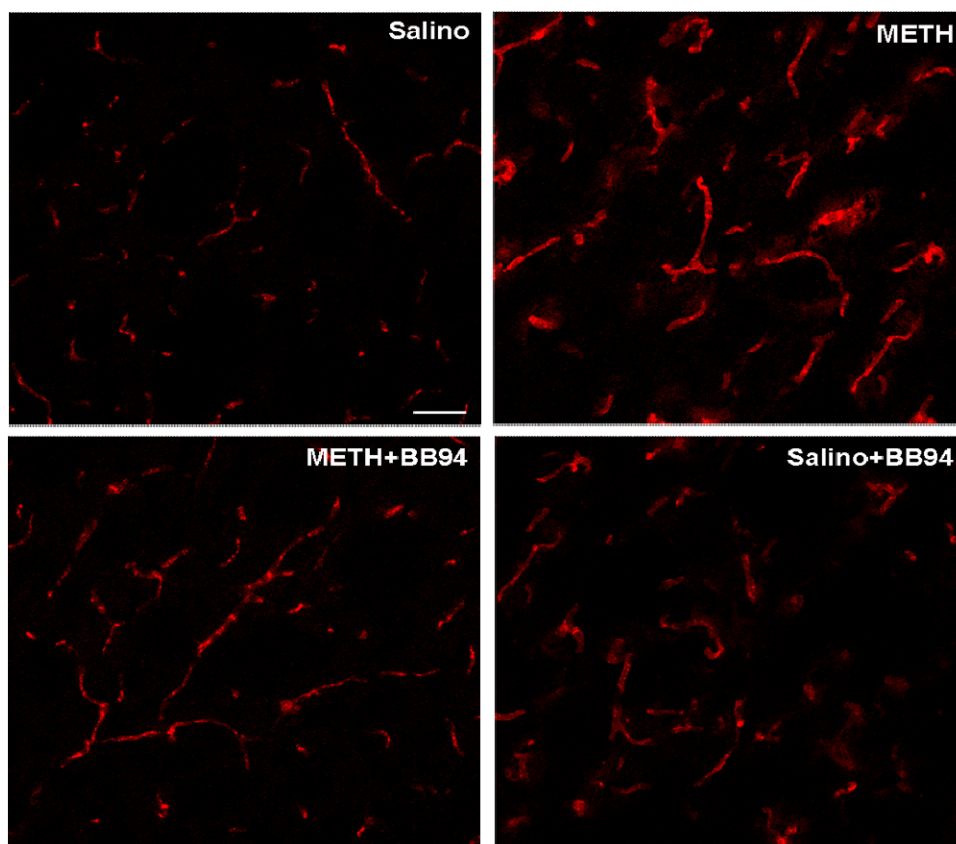


Figura 46. Efecto de BB-94 (50 mg/kg, i.p) sobre la extravasación de IgG inducida por metanfetamina (METH, 4 mg/kg, 3 veces, cada 3 h, i.p.). BB-94 se administró 30 minutos antes de la primera y última inyección de METH. Los animales fueron sacrificados 1 h después de la última inyección de la droga. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.E.M. de la intensidad integrada de fluorescencia en porcentaje respecto a la media del grupo salino ( $n = 4-5$ ). Diferente de salino: \* $p < 0.05$ ; Diferente de METH  $^{\Delta}p < 0.05$ .

Respecto a la temperatura rectal, el ANOVA de dos vías revela que hay un efecto significativo del tratamiento ( $F_{3,83} = 37.07$ ,  $p < 0.0001$ ). El test post hoc indica que metanfetamina incrementa la temperatura rectal 30-60 minutos tras la inyección de la droga ( $F_{1,55} = 83.32$ ,  $p < 0.0001$ ). BB-94 administrado 30 minutos antes de la primera y última inyección atenúa el efecto hipertérmico inducido por la droga ( $F_{1,50} = 13.26$ ,  $p < 0.001$ ), pero no modifica la temperatura rectal de los ratones tratados con salino ( $F_{1,33} = 0.1436$ ,  $p=0.69$ ) (figura 47).

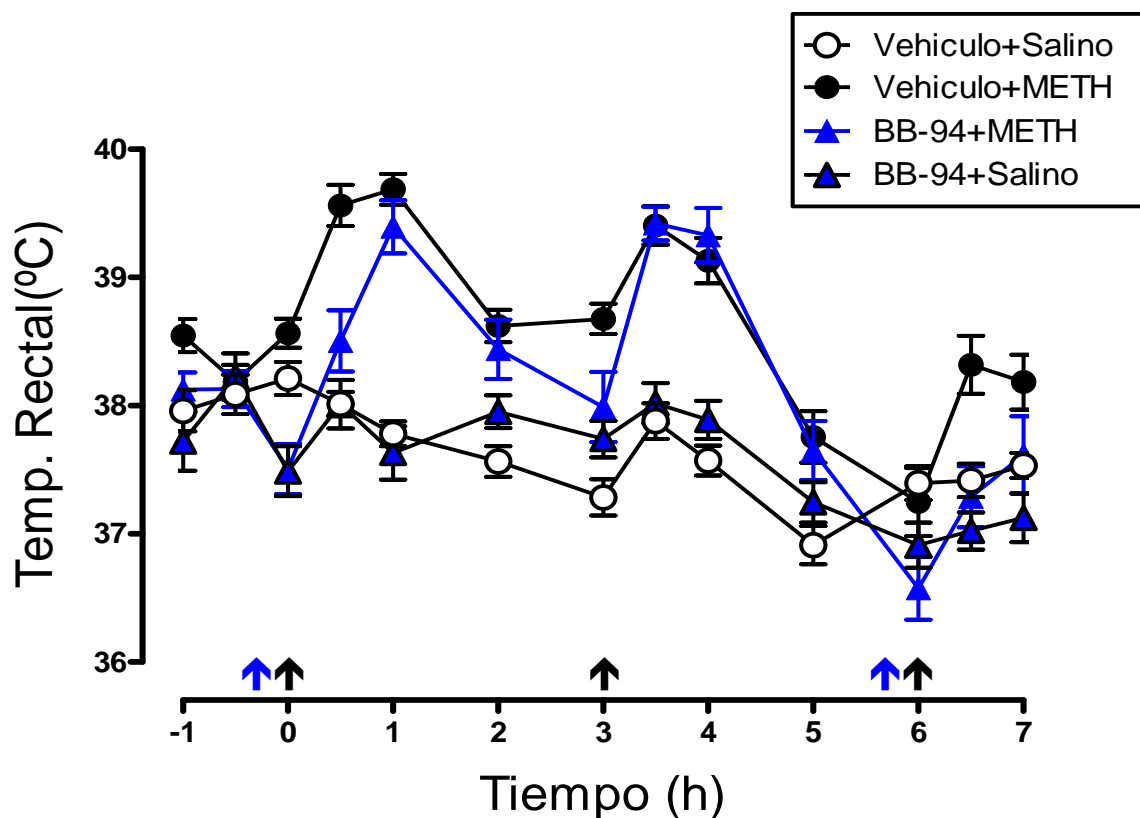


Figura 47. Efecto de BB-94 (50 mg/kg, i.p) sobre el incremento en la temperatura rectal inducido por metanfetamina (METH, 4 mg/kg, 3 veces, cada 3 h, i.p). BB-94 se administró 30 minutos antes de la primera y última inyección de METH. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  E.E.M. de la temperatura rectal en  $^{\circ}\text{C}$  ( $n = 4-5$ ). Las flechas negras indican la administración de metanfetamina y la azul la de BB-94.

Para determinar la temperatura corporal participa en los efectos de BB-94 sobre los cambios inducidos por metanfetamina en la degradación de laminina y la expresión de MMP-9, se administró



la droga a los animales mantenidos en un ambiente de baja temperatura (4 °C). En estas condiciones, la administración de metanfetamina no induce la característica hipertermia, sino que se produce una disminución en la temperatura rectal de los animales que revierte a las 3 h de la administración de la droga (figura 48). Pese a que la temperatura rectal de los animales tratados con la droga es superior a la de los salinos ( $F_{1,35}=4.78$ ,  $p=0.035$ ) en un ambiente frío (4° C), no se observa la característica hipertermia inducida por metanfetamina a una temperatura ambiente estándar.

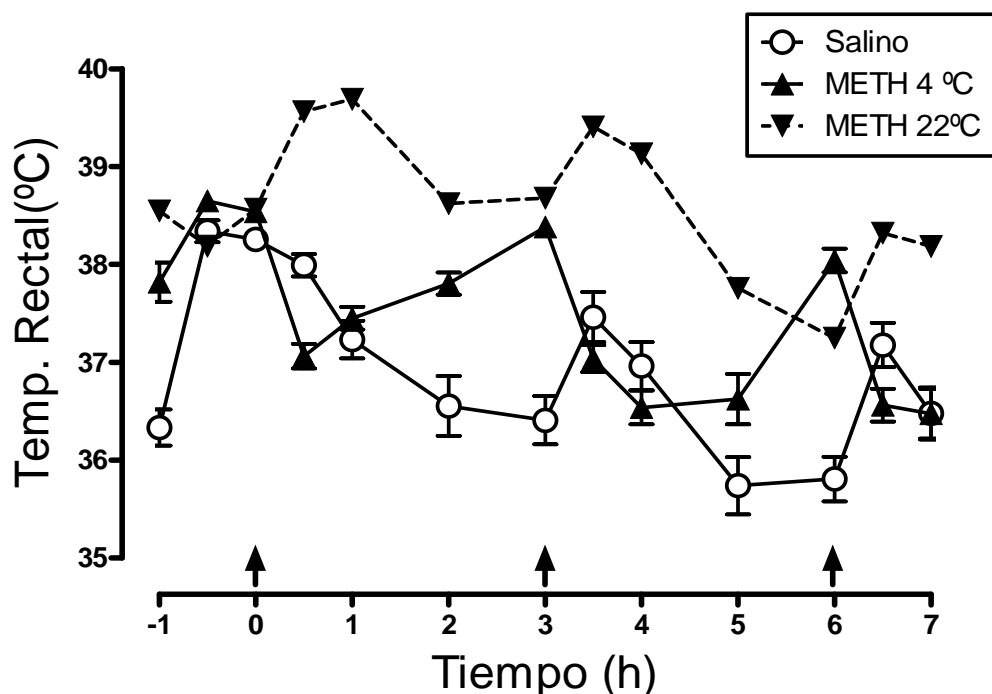


Figura 48. Efecto de metanfetamina (METH, 4 mg/kg, 3 veces, cada 3 h, i.p.) sobre la temperatura rectal de los ratones inyectados en un ambiente a 22 °C y en un ambiente a 4 °C. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  E.E.M. de la temperatura rectal en °C ( $n = 4-5$ ). Las flechas negras indican la administración de metanfetamina.

#### 4. Efecto de metanfetamina sobre la activación de MMP-9 y la expresión de laminina en el estriado de ratones mantenidos a 4 °C

Respecto a la actividad de MMP-9, el ANOVA de una vía indica que en estas condiciones experimentales hay un efecto significativo del tratamiento ( $F_{1,35} = 4.52$ ,  $p=0.035$ ). El análisis post hoc revela que la administración de metanfetamina induce la activación de MMP-9 estriatal 1 h tras la administración de la droga ( $2.81 \pm 1.1$  u.a. vs.  $5.81 \pm 0.91$  u.a., respecto a salino), que es significativamente menor que la inducción que se produce a una temperatura ambiente estándar

( $5.81 \pm 0.91$  u.a. vs.  $8.64 \pm 0.84$  u.a.). Este aumento en la actividad revierte a las 3 h hasta niveles del salino ( $2.81 \pm 1.1$  u.a. vs.  $2.43 \pm 0.61$  u.a.) (figura 49).

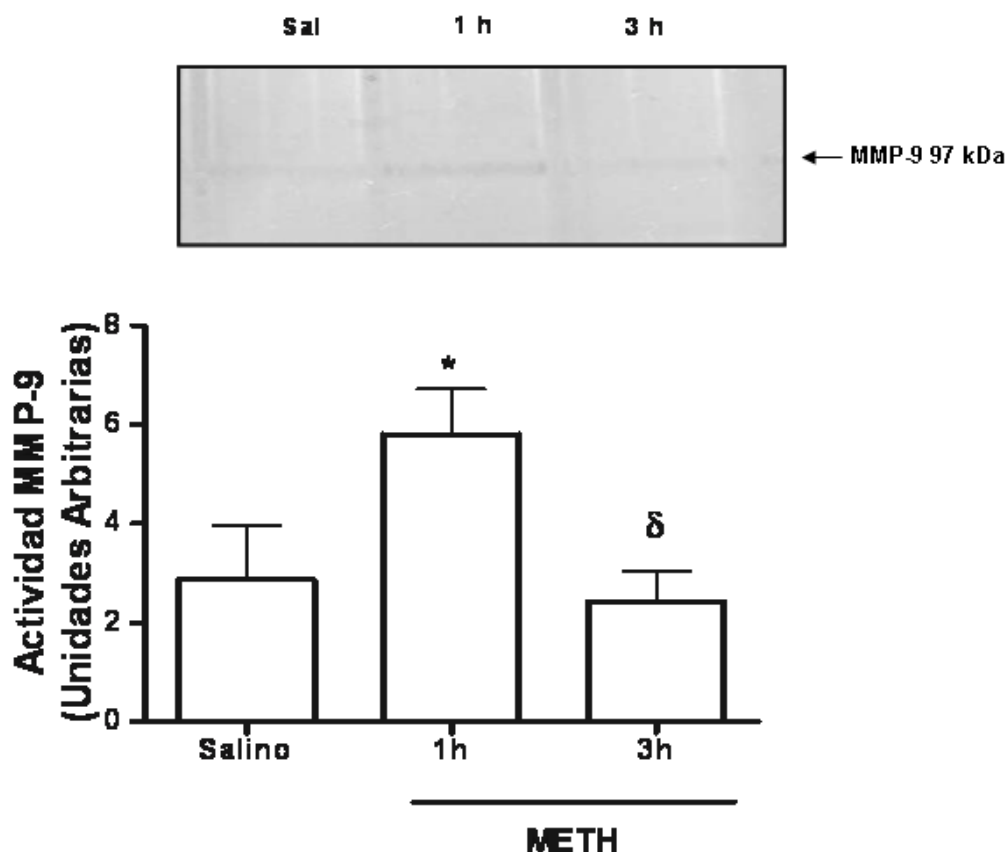


Figura 49. Efecto de metanfetamina (METH, 4 mg/kg, 3 veces, cada 3 h, i.p.) sobre la actividad estriatal de MMP-9 en ratones mantenidos a 4 °C. Los animales fueron sacrificados 1 y 3 h tras la última inyección de la droga. La figura muestra una zimografía representativa de la curva temporal de la actividad de MMP-9 1 y 3 h tras la administración de la droga. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  E.E.M. de la densidad óptica en unidades arbitrarias ( $n = 7-8$ ). Diferente de salino: \* $p < 0.05$ . Diferente de METH 1 h:  $\delta p < 0.05$ .

La inhibición de la hipertermia no altera la disminución de laminina inducida metanfetamina ( $100 \pm 9.78$  % vs.  $69.1 \pm 6.53$  %) ( $t = 0.021$ ), como se observa en la figura 50.

Por tanto, los efectos protectores del BB-94 no se pueden relacionar con su efecto sobre la hipertermia inducida por metanfetamina.

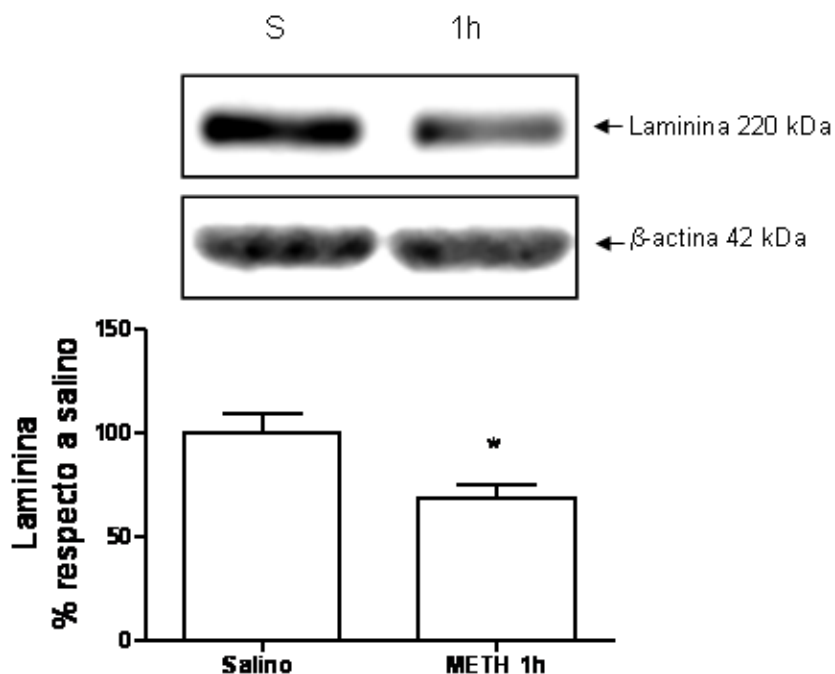


Figura 50. Efecto de metanfetamina (METH, 4 mg/kg, 3 veces, cada 3 h, i.p.) sobre la actividad estriatal de MMP-9 en ratones mantenidos a 4 °C. Los animales fueron sacrificados 1 h tras la última inyección de la droga. La figura muestra un Western blot representativo de la expresión de laminina. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  E.E.M. de la expresión de la proteína normalizada por su  $\beta$ -actina y en porcentaje respecto a la media del salino ( $n = 5-7$ ). Diferente de salino: \* $p < 0.05$ .

## 5. Implicación de los cambios inducidos por metanfetamina sobre la permeabilidad de la BHE en la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por metanfetamina

Metanfetamina actúa como una neurotoxina dopaminérgica selectiva en el cerebro del ratón C57BL/6J. Como hemos demostrado anteriormente, también incrementa la actividad de MMP-9, induce la degradación de laminina y provoca la disrupción de la BHE. Puesto que dicha ruptura altera la homeostasia del cerebro, hemos analizado la implicación de las alteraciones en la BHE en la dicha neurotoxicidad. Para ello se han administrado BB-94 y SP600125, que previenen los efectos de metanfetamina sobre la activación de MMP-9, la degradación de laminina y la disrupción de la BHE, y se han analizado los niveles de DA y sus metabolitos DOPAC y HVA, así como la expresión del DAT como marcadores de la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por la droga.

### 5.1 Efecto de BB-94 sobre la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por metanfetamina

El ANOVA de una vía revela un efecto significativo del tratamiento para DA ( $F_{2,10} = 279.8$ ,  $p < 0.0001$ ), DOPAC ( $F_{2,12} = 59.7$ ,  $p < 0.0001$ ), HVA ( $F_{2,14} = 36.6$ ,  $p < 0.0001$ ) y DAT ( $F_{2,13} = 16.73$ ,  $p = 0.0003$ ). El test post hoc indica que el tratamiento con metanfetamina disminuye el contenido de DA, DOPAC, HVA, y DAT respecto a los animales inyectados con salino, y que esta disminución es semejante en los animales tratados con BB-94 y metanfetamina (figura 51).

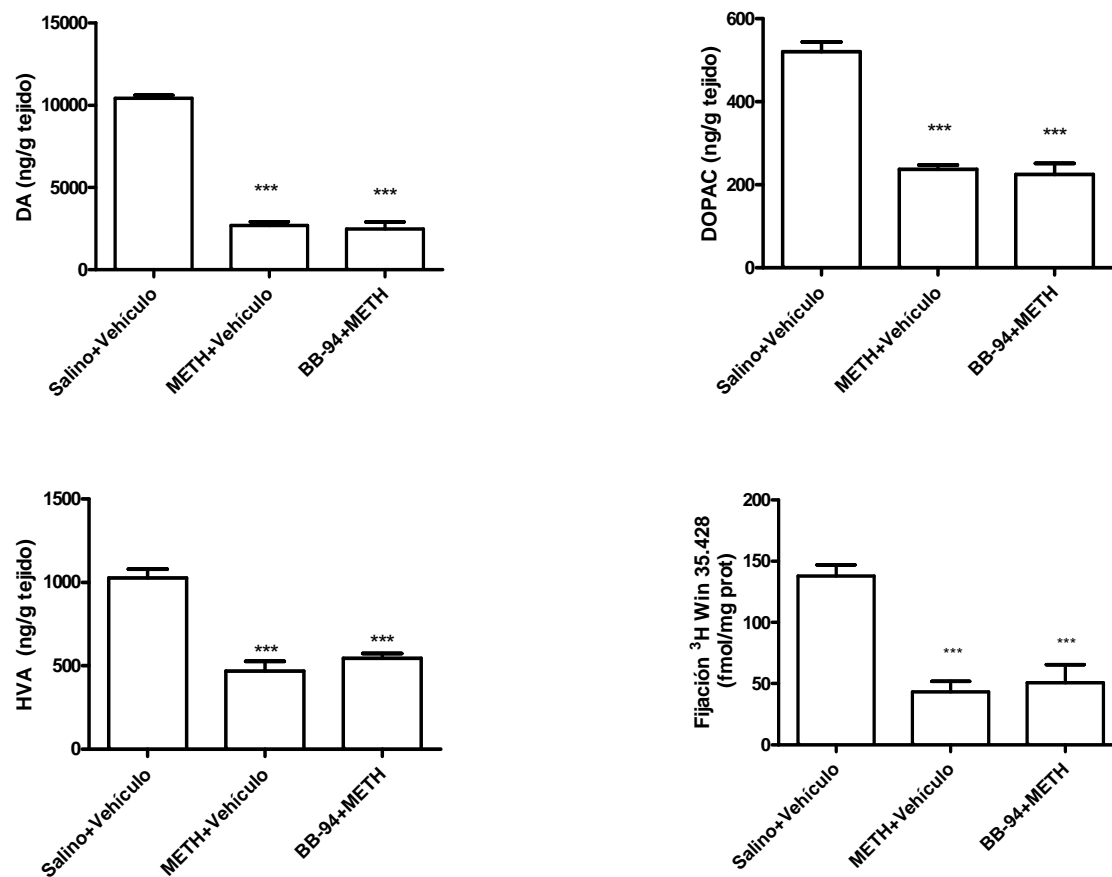


Figura 51. Efecto de BB-94 (50 mg/kg i.p) sobre la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por metanfetamina (METH, 4 mg/kg, 3 veces, cada 3 h, i.p) en el estriado de ratón. Los animales fueron sacrificados 7 días tras la última inyección de la droga. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  E.E.M. ( $n = 4-7$ ). Diferente de Salino+Vehículo: \*\*\* $p < 0.001$ .

## **5.2 Efecto de SP600125 sobre la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por metanfetamina.**

Previamente hemos comprobado que la activación de la vía de JNK1/2 media el incremento en la permeabilidad de la BHE a través de la activación de MMP-9. En este estudio hemos analizado la implicación de esta vía en la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por metanfetamina en el estriado de ratón.

El ANOVA de una vía revela un efecto significativo del tratamiento para DA ( $F_{3,21} = 89.2$ ,  $p < 0.0001$ ), DOPAC ( $F_{3,22} = 89.6$ ,  $p < 0.0001$ ), HVA ( $F_{3,21} = 69.0$ ,  $p < 0.0001$ ) y DAT ( $F_{3,17} = 11.1$ ,  $p = 0.0003$ ). El test post hoc indica que el tratamiento con metanfetamina disminuye el contenido de DA, DOPAC, HVA, y DAT respecto a los animales inyectados con salino, y que esta disminución es semejante en los animales tratados con SP600125 y metanfetamina (figura 52). La administración única de SP600125 no modifica ninguno de los parámetros.

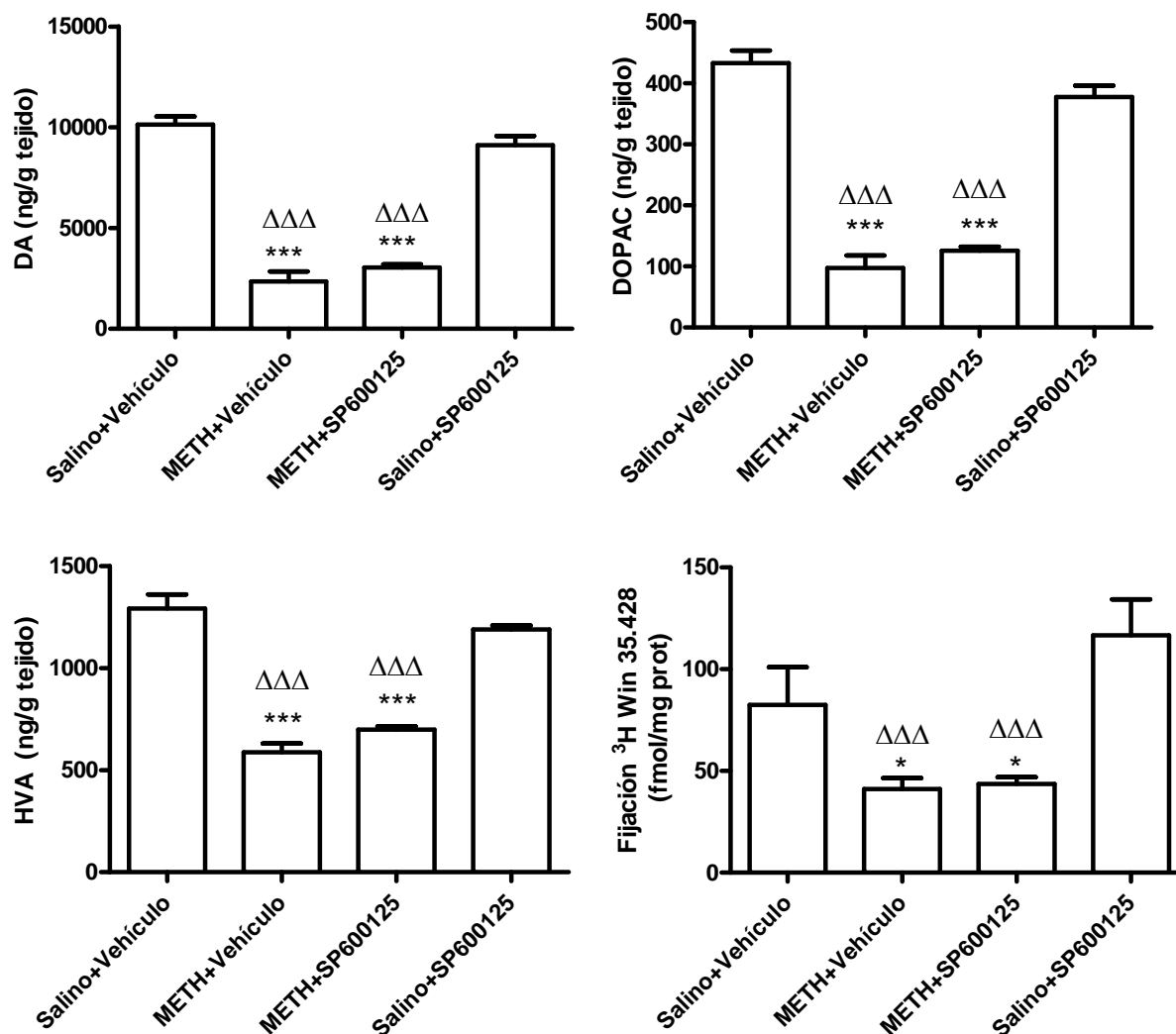


Figura 52. Efecto de SP600125 (30 mg/kg i.p) sobre la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por metanfetamina (METH, 4 mg/kg, 3 veces, cada 3 h, i.p) en el estriado de ratón. Los animales fueron sacrificados 7 días tras la última inyección de la droga. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  E.E.M. (n = 5-8). Diferente de Salino+Vehículo: \* p < 0.05; \*\*\*p < 0.001. Diferente de SP600125+Vehículo:  $\Delta\Delta\Delta$ p < 0.001.

## 6. Efecto de metanfetamina sobre la presión arterial de los ratones

Un incremento en la presión arterial inducido por metanfetamina podría ser responsable de las variaciones en la permeabilidad de la BHE. Por tanto, hemos analizado el efecto de la droga sobre la presión arterial de ratones inyectados con metanfetamina 4 mg/kg, 3 veces, cada 3 h, i.p (tabla 6).

El ANOVA de dos vías de medidas repetidas indica que la administración de metanfetamina no produce un efecto significativo sobre la presión arterial media de los ratones.

Tiempo	tratamiento	- 6 - 0 min	0 - 6 min	6 - 12 min	12 - 18 min	18-24 min
1º inyección	Salino	77.1 ± 2.7	74.1 ± 1.7	73.5 ± 2.1	72.6 ± 2.5	71.1 ± 2.6
	Meth	83.2 ± 4.3	80.1 ± 5.1	79.9 ± 5.5	78.3 ± 5.5	77.6 ± 5.2
2º inyección	Salino	70.3 ± 4	67.7 ± 4.2	68.1 ± 5.7	67.9 ± 4.9	67.9 ± 4.8
	Meth	65.3 ± 2	65.3 ± 5.9	67.0 ± 3	69.6 ± 0.9	69.9 ± 2.1
3 inyección	Salino	68.1 ± 4	68.8 ± 4.6	67.5 ± 5.5	67.3 ± 4.6	67.1 ± 4.6
	Meth	57.6 ± 1	56.1 ± 1.4	55.7 ± 1.1	58.7 ± 3.8	56.8 ± 2.3
24 h	Salino	81.1 ± 6.8	NA	NA	NA	NA
	Meth	76.9 ± 7.9	NA	NA	NA	NA

Tabla 6. Efecto de metanfetamina (METH, 4 mg/kg, 3 veces, cada 3 h, i.p.) sobre la presión arterial media de los ratones. Los datos están expresados como la media ± E.E.M. de la presión arterial medida en mm de Hg (n = 4-5 animales por grupo). NA: datos que no se han adquirido.

# DISCUSIÓN



## Estudio temporal de la activación de las MMPs e integridad de la BHE

La BHE impide el intercambio libre de moléculas e iones entre el plasma sanguíneo y el parénquima cerebral, desempeñando un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del cerebro.

Las metaloproteinasas (MMPs) son endopeptidasas dependientes de zinc y calcio. Aunque fisiológicamente son esenciales en el remodelado de la matriz extracelular, en gran variedad de patologías se ha observado la sobreactivación de dos de ellas (las gelatinasas MMP-9 y MMP-2). Este efecto conduce a una exagerada degradación de componentes de la matriz neurovascular que se relaciona con la ruptura de la BHE, la respuesta neuroinflamatoria, y la muerte celular (Bonoiu et al., 2009; Kieseier et al., 1999; Lindberg et al., 2001; Montaner et al., 2001; Zhou et al., 2011).

El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral demuestra que la administración aguda y repetida de dosis bajas de metanfetamina (4 mg/kg, i.p, 3 veces cada 3 h) produce un incremento en la expresión proteica y en la actividad gelatinasa de MMP-9 en el estriado del ratón, que está asociado a un aumento en la degradación de laminina. Como consecuencia de estos cambios aumenta la permeabilidad de la BHE.

Como se ha mostrado previamente, esta regulación al alza de MMP-9 se observa 1 h tras la última administración de metanfetamina, siendo más pronunciado el incremento en la actividad gelatinasa (207 %) que en la expresión proteica (23 %). Tras esta activación, tanto la actividad gelatinasa como los niveles de proteína del enzima comienza a disminuir y a las 3 h ambos valores son similares a los observados en los animales tratados con salino. MMP-9 se analizó mediante Western blot y zimografía en gel y pese a que las dos técnicas se consideran una medida de la expresión del enzima, la zimografía detecta la fracción con actividad ex-vivo, mientras que la inmunodetección por Western blot revela toda la proteína presente en la muestra. Estas dos poblaciones no tienen por qué coincidir necesariamente y de hecho, el grado de solapamiento entre ellas varía de una MMP a otra. Otro factor que puede contribuir a la discrepancia observada es la diferencia entre las sensibilidades de las técnicas, ya que la actividad detectada en la zimografía puede corresponder a cantidades de proteína en el orden de picogramos (Kleiner and Stetler-Stevenson, 1994), posiblemente por debajo del límite de detección de las mediciones realizadas por Western blot.

La actividad gelatinasa total en el estriado de ratón se midió mediante la zimografía *in situ*. Con esta técnica se puede analizar la localización y actividad MMP en condiciones fisiológicas, ya que se realiza en cortes histológicos sin fijar, en los que se mantiene la integridad del tejido y a diferencia de la zimografía en gel, no se produce la disociación del enzima de sus inhibidores naturales

(TIMP), que forman el complejo inactivo MMP-TIMP. Sin embargo, con la zimografía *in situ* no se puede establecer el subtipo de MMP que incrementa su actividad. Por ello, es necesario realizar técnicas complementarias como la zimografía en gel o el Western blot, en las que la actividad o expresión de las diferentes gelatinasas puede estudiarse por separado. En nuestro estudio no hemos observado cambios en la expresión ni actividad de MMP-2, la cuál se expresa de manera constitutiva. Los niveles de la forma pro-activa de MMP-9 en el estriado son indetectables, lo que sugiere que en nuestras condiciones experimentales, la expresión constitutiva de este enzima es muy baja. Puede ser que los cambios observados en la zimografía *in situ* sean de menor magnitud que los de la zimografía en gel (28 % vs. 207 % respectivamente) debido al efecto tamponador de la actividad constitutiva de MMP-2.

Por tanto, y mediante técnicas complementarias, hemos demostrado que la administración de metanfetamina induce la activación de MMP-9 en el estriado del ratón 1 h tras la última administración de la droga.

Hay pocos estudios que hayan documentado el efecto de la metanfetamina sobre la actividad de las MMPs. Recientemente se ha demostrado en ratones que la administración de una única dosis elevada de metanfetamina (40 mg/kg, i.p) incrementa la expresión total de MMP-9 (medida por ELISA) 6 h tras la inyección de la droga (Conant et al., 2011), aunque no se ha analizado la actividad del enzima. Estos resultados son consistentes con un estudio anterior, que muestra que la misma dosis de metanfetamina aumenta los niveles cerebrales de ARN mensajero de MMP-9 (Liu et al., 2008). El efecto de dosis bajas de metanfetamina en la regulación de MMPs fue estudiado por Mizoguchi y colaboradores en ratas. Los autores mostraron que una dosis diaria (2 mg/kg, i.p) administrada durante 5 días consecutivos incrementa tanto la actividad de MMP-2 como de MMP-9 en neuronas y en células gliales de la corteza frontal y el núcleo *accumbens*. Este trabajo sugiere que MMP-2/-9 desempeñan un papel crucial en los efectos de sensibilización y recompensa inducidos por metanfetamina al regular la liberación de dopamina inducida por la droga así como su recaptación en el núcleo *accumbens* (Mizoguchi et al., 2007).

Dado el incremento observado en la actividad de MMP-9, hemos estudiado alguno de sus potenciales sustratos. La laminina es un componente de la matriz extracelular y ha sido identificado como uno de los sustratos de MMP-9 (Gu et al., 2005), la cual es capaz de degradar también otras proteínas de la lamina basal cerebrovascular como colágeno tipo IV o fibronectina. Concomitante con un incremento en la actividad de MMP-9, observamos una disminución de la expresión de laminina 1 h tras la última administración de metanfetamina. Este daño inducido por la droga sobre

la integridad vascular podría llevar a la ruptura de la BHE y causar un edema vasogénico, producido por la extravasación de sangre al parénquima cerebral (Gasche et al., 1999; Heo et al., 1999; Mun-Bryce and Rosenberg, 1998; Rosenberg, 2002; Rosenberg et al., 1996; Sternlicht and Werb, 2001). Existen algunos estudios previos sobre los efectos de metanfetamina en la integridad de la BHE en ratones, pero casi todos han administrado una única dosis muy alta (30 ó 40 mg/kg i.p). En estos estudios se ha descrito una extravasación masiva de albúmina al parénquima cerebral en la corteza cerebral y en regiones del sistema límbico como el hipocampo o la amígdala (Bowyer and Ali, 2006; Martins et al., 2011; Sharma and Ali, 2006), mientras que en el núcleo *accumbens* el incremento en la inmunoreactividad de la IgG extravasada es menor que en las anteriores estructuras (Bowyer et al., 2008). En ratas, una única inyección de metanfetamina (9 mg/kg, s.c) también indujo la ruptura de la BHE. Comparado con los animales tratados con salino, tanto la extravasación del trazador azul de Evans como la de albúmina, se incrementaron notablemente en varias áreas cerebrales, siendo estos cambios más pronunciados cuando se administró la droga a 29 °C que cuando se administró a 23 °C (Kiyatkin and Sharma, 2009), demostrando la implicación de la temperatura corporal sobre la integridad de la BHE. Esta Tesis Doctoral confirma y extiende estas observaciones mostrando que la administración repetida de dosis bajas de esta droga es suficiente para inducir cambios en la integridad de la BHE en el estriado del ratón.

Los estudios de extravasación de IgG muestran una mayor inmunoreactividad en el parénquima cerebral de los animales tratados con metanfetamina 1, 3 y 24 h tras la última administración de la droga que en los animales control. Como muestran los estudios de colocalización, dicho marcaje coincide con el incremento de la actividad gelatinasa alrededor de los capilares sanguíneos cerebrales, indicando que la ruptura de la BHE ocurre en las áreas en las que metanfetamina induce un aumento de la actividad MMP (figura 38). Posiblemente relacionado con estos efectos vasculares, el abuso de metanfetamina se ha asociado en humanos con una mayor prevalencia de infarto isquémico y hemorragia intracerebral y subaracnoidea en consumidores de esta droga (Ho et al., 2009).

El tipo celular involucrado en el aumento de la actividad MMP-9 no se ha esclarecido completamente. Algunos trabajos sugieren que proviene del SNC, con las células endoteliales (Herron et al., 1986), microglia, y/o neuronas (Gottschall and Deb, 1996; Gottschall et al., 1995; Oh et al., 1999; Zuo et al., 1998) como responsables, mientras que otros sugieren un origen periférico, siendo neutrófilos y otras células del linaje leucocitario la fuente de la actividad MMP (Asahi et al., 2000; Magnoni et al., 2004). Se ha demostrado que las células endoteliales secretan MMP-9 en

dirección al parénquima cerebral, facilitando por tanto la degradación de la membrana basal. La proteólisis de los componentes de la matriz extracelular que rodea los vasos cerebrales se ha asociado a una mayor permeabilidad vascular y pérdida de la integridad de la BHE, lo que llevaría a la formación de edema cerebral e infiltración de leucocitos. Anteriormente nuestro grupo (Elali A, 2012) ha demostrado mediante estudios de inmunohistoquímica con el marcador de leucocitos CD45, que no se produce un aumento significativo en la infiltración de estas células al cerebro tras la administración de metanfetamina, pese a observarse un aumento en la expresión de las proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM en los microvasos cerebrales. Estos datos muestran por tanto, que la administración repetida de bajas dosis de metanfetamina induce la ruptura de la BHE de manera moderada, aunque insuficiente para promover la infiltración de leucocitos. No obstante, la expresión de proteínas de adhesión sugiere que estímulos mayores podrían inducir la infiltración de estas células al parénquima cerebral.

Con respecto a la dosis utilizada, la administración repetida de 4 mg/kg de metanfetamina es un modelo más aproximado al consumo realizado en los humanos que una única inyección de 30 ó 40 mg/kg. En humanos, se ha descrito que el patrón de administración suele ser de 4 administraciones diarias en las que las dosis pueden variar entre 50 y 500 mg (Cruickshank and Dyer, 2009), si bien las dosis más altas son casos excepcionales. La administración de 4 mg/kg a un ratón se correspondería con una dosis equivalente en humano (DEH) de aproximadamente 19 mg, mientras que la dosis de 40 mg/kg equivaldría a 192 mg, según la ecuación recomendados por la FDA para el cálculo de la DEH (Reagan-Shaw et al., 2008). Por tanto, los cambios observados en nuestro modelo podrían modelar de manera más acertada lo que ocurre en el humano que los estudios anteriormente mencionados.

### **Estudio de la implicación de JNK1/2 en la activación de MMP-9 y la integridad de la BHE**

Las MAP quinasas (MAPK de sus siglas en inglés *mitogen- activated protein kinases*), son una serie de serin-treonin quinasas que median la señalización intracelular y se asocian a una gran variedad de actividades celulares, como supervivencia, diferenciación, proliferación, muerte y transformación (Kim and Choi, 2010).

El estrés celular es una de las causas de la activación de MMP-9 (Freeman and Keller, 2012) y JNK1/2, también conocida como SAPK1/2 (del inglés *stress activated kinase 1/2*), es una de las principales MAPK involucradas en respuestas de estrés (Schaeffer and Weber, 1999). La

importancia de esta quinasa se refleja en que la activación de JNK1/2 se ha observado en diversas patologías neurodegenerativas como isquemia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y tras la administración de metanfetamina (Elali A, 2012; Kim and Choi, 2010).

Esta quinasa, puede ser activada por estrés oxidativo y por mediadores inflamatorios (Yoshimura et al., 2005), estímulos ambos que son producidos por metanfetamina (Gonçalves et al., 2008; Krasnova and Cadet, 2009). Dado que metanfetamina induce la activación de MMP-9, como hemos demostrado anteriormente, hemos estudiado la implicación de la activación de la vía de JNK1/2 en la activación de MMP-9 y la integridad de la BHE. Previamente se ha observado que la administración de metanfetamina a ratones hembra (10 mg/kg s.c 4 veces cada 2 h) induce la fosforilación de JNK1/2 6 y 24 h tras la última inyección de la droga (Hebert and O'Callaghan, 2000). Nuestros estudios extienden esa información mostrando que la administración de dosis menores de metanfetamina (4 mg/kg, i.p, 3 veces cada 3 h) produce un aumento de los niveles de p-JNK1/2 1 y 3 h tras la última inyección de la droga. No se observaron diferencias respecto a los animales control a las 24 h.

Para evaluar la implicación de esta vía sobre los cambios observados en MMP-9, se inhibió la actividad de JNK1/2 *in vivo* mediante la administración del inhibidor específico de JNK, SP600125, junto con la última inyección de metanfetamina. Se eligió este inhibidor, de la familia de las antrapirazonas, debido a que es 300 veces más afín a JNK que a p38, ERK1/2 o PKA, y a su amplio uso en la literatura. A la dosis utilizada en nuestros experimentos (30 mg/kg i.p), SP600125 redujo el incremento en los niveles de p-JNK1/2 observado en el estriado 1 h tras la administración de metanfetamina. Los datos muestran que SP600125 abolió el incremento en la actividad de MMP-9, redujo la degradación de laminina y el incremento en la inmunoreactividad de IgG sin afectar a la hipertermia inducida por metanfetamina. La implicación de JNK1/2 en la modulación de MMP-9 en nuestro modelo se ve apoyada por los experimentos de Wu y colaboradores (Wu et al., 2009), que *in vitro* demostraron que JNK1/2 modula la expresión de MMP-9 en astrocitos a través de la interleuquina 1 $\beta$ , así como por los de Yoshimura y colaboradores (Yoshimura et al., 2005), que observaron que TNF alfa induce la expresión de MMP-9 vía JNK1/2 en varios paradigmas experimentales, tanto *in vitro*, como *ex vivo*. Por tanto, la administración de metanfetamina, a través de la liberación de mediadores de la inflamación como TNF alfa o interleuquinas, podría activar la ruta de JNK1/2 mediante su fosforilación, modificando la actividad de distintos factores transcripcionales, entre los que destaca AP1, que posee lugares de unión en las regiones promotoras

de MMP-9 pero no de MMP-2 (Rosenberg, 2009), lo que podría explicar la regulación selectiva de los enzimas. Una vez que se produjera la activación de MMP-9, ésta degradaría proteínas de la lámina basal, lo cual afectaría a la estabilidad e integridad de la BHE, permitiendo el paso de sustancias que en condiciones normales estarían ausentes del parénquima cerebral, y alterando la homeostasis cerebral.

Nuestros resultados muestran que la activación de JNK1/2 es uno de los mecanismos que participan en las alteraciones inducidas por metanfetamina en la integridad de la lámina basal y la BHE *in vivo*. Esta Tesis Doctoral está en concordancia con otro estudio de nuestro laboratorio, en el que hemos demostrado que esta vía está involucrada en la regulación de la expresión de los transportadores ABCB1 y ABCC1 (Elali A, 2012), y que dicha regulación comparte mecanismos con otro tipo de patologías cerebrales como puede ser un modelo de isquemia cerebral (ElAli and Hermann, 2010), lo que sugiere que la activación de JNK1/2 es una de las respuestas básicas que ocurren frente a un daño. Así pues, dada la importancia que tiene esta ruta en la fisiopatología de la BHE, la inhibición de la actividad de JNK1/2 puede representar una nueva y efectiva estrategia para paliar los efectos tóxicos inducidos por la droga.

### **Estudio de la implicación de MMP-9 en la integridad de la BHE**

Para determinar el papel específico de la activación de MMP-9 inducida por metanfetamina en la proteólisis de la lámina basal y la consiguiente ruptura de la BHE se administró el inhibidor de MMPs Batimastat (BB-94) (50 mg/kg i.p) 30 minutos antes de la primera y última inyección de la droga. Se eligió el BB-94 en base a una elevada afinidad y selectividad por las MMPs ( $IC_{50} \sim 4$  nM). Además, Rosenberg y colaboradores (Rosenberg et al., 2007), han demostrado en los ratones C57BL/6J que este es el único inhibidor selectivo de MMPs que impide el paso de sacarosa marcada radiactivamente a través de la BHE tras la administración de LPS es el BB-94, pese a que en la rata son varios los inhibidores de MMPs que demuestran ser eficaces.

BB-94 previno la disminución en la expresión de laminina y el incremento en la permeabilidad de la BHE inducido por metanfetamina, implicando a las MMPs en la ruptura de la BHE a través de la degradación de las proteínas de la lámina basal. La administración de BB-94, pese a que no previno la hipertermia por metanfetamina, sí redujo el incremento en la temperatura corporal inducido por la droga, de manera que la hipertermia inducida por la primera y tercera dosis de metanfetamina fue ligeramente menor que la observada en ratones inyectados únicamente con metanfetamina. Para

descartar la posibilidad de que los efectos protectores observados en los ratones tratados con BB-94 y metanfetamina se debieran a la capacidad del compuesto para reducir la hipertermia, administramos metanfetamina a ratones mantenidos en una cámara fría a una temperatura de 4 °C. En estas condiciones ambientales y acorde con lo descrito en la literatura (Ali et al., 1994; Miller and O'Callaghan, 1994), aunque la temperatura rectal de los animales tratados con la droga fue mayor que la de los animales tratados con salino, la administración de metanfetamina no produjo la característica hipertermia (figura 48). A pesar de esto, los efectos inducidos por metanfetamina sobre la actividad de MMP-9, así como sobre la expresión de laminina fueron todavía evidentes. Estos datos sugieren que la capacidad de BB-94 para prevenir los efectos de metanfetamina sobre la actividad de MMP-9 y la integridad de la lámina basal, no está relacionada con su capacidad para atenuar la hipertermia de metanfetamina.

Cuando metanfetamina se administró a los animales mantenidos en un ambiente frío, el incremento en la actividad estriatal de MMP-9 (102%) fue menor que el observado en ratones mantenidos a temperatura ambiente estándar (207%). Estos resultados indican que la hipertermia desempeña un papel importante en la activación de MMP-9. Recientemente se ha demostrado que al elevar la temperatura corporal de ratas sometidas a isquemia cerebral, se producía una mayor activación de MMP-9, así como un aumento en la degradación de laminina en el estriado (Meng et al., 2012). En nuestro modelo, pese a que la actividad de MMP-9 se redujo notablemente al administrar metanfetamina a los animales mantenidos en cámara fría, no observamos cambios significativos en la degradación de laminina frente a los animales que recibieron metanfetamina a temperatura ambiente. Estos datos sugieren que la laminina es muy sensible a la activación de MMP-9, y que no son necesarios unos niveles muy altos del enzima activado para que se produzca la degradación de esta proteína de la matriz extracelular.

En conjunto, estos datos sugieren que MMP-9 es el principal factor que interviene en las alteraciones de la integridad de la BHE que produce metanfetamina, y que la capacidad de BB-94 para prevenir estos cambios no se debe a su efecto sobre la temperatura corporal.

### **Estudio de la implicación de la activación de MMP-9 y JNK1/2 en la neurotoxicidad inducida por metanfetamina**

Como hemos mencionado, la BHE desempeña un papel fundamental en la homeostasis del cerebro. Previamente hemos demostrado que la administración de una dosis neurotóxica de metanfetamina (4

mg/kg, i.p, 3 veces cada 3 h) incrementa la actividad de MMP-9 en el estriado de ratón, lo que lleva a la proteólisis de componentes de la matriz vascular y ruptura de la BHE, y por tanto una alteración en la homeostasis del cerebro, que podría hacer más susceptibles a los terminales dopaminérgicos al daño neuronal inducido por metanfetamina. Así pues, en esta Tesis Doctoral, hemos investigado la implicación de MMP-9 en la neurotoxicidad a largo plazo sobre los terminales dopaminérgicos inducida por metanfetamina. Para ello hemos evaluado la capacidad del inhibidor de MMPs BB-94 para prevenir la disminución en los niveles de DA, DOPAC y HVA, así como en la densidad del DAT inducida por la droga 7 días tras la inyección de dosis neurotóxicas de metanfetamina. El tratamiento con BB-94 (50 mg/kg) 30 minutos antes de la primera y última inyección de la droga no modificó la neurotoxicidad en los terminales dopaminérgicos inducida por metanfetamina.

Paralelamente, hemos analizado la implicación de la activación de la vía de JNK1/2 sobre los mismos parámetros dopaminérgicos mencionados. Los estudios sobre enfermedad de Párkinson han desvelado que la ruta de JNK1/2 está implicada en la apoptosis neuronal, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (Pan et al., 2007; Peng et al., 2004). De hecho, cuando se elimina genéticamente JNK, los ratones se encuentran protegidos de la toxicidad dopaminérgica del MPTP (Hunot et al., 2004). El tratamiento con SP600125 (30 mg/kg, i.p), como hemos demostrado previamente inhibe el incremento de actividad de MMP-9, la degradación de laminina y la ruptura de la BHE. Sin embargo, este tratamiento no protege de la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por metanfetamina. En un trabajo previo se había mostrado que los ratones heterocigotos para c-Jun, que es la principal diana de JNK1/2, eran resistentes a la apoptosis inducida por una única dosis alta de metanfetamina (40 mg/kg) en el estriado del ratón (Deng et al., 2002), aunque estos autores no investigaron la degeneración de los terminales dopaminérgicos. Nuestros datos muestran que la toxicidad en los terminales dopaminérgicos producida por metanfetamina no se altera por la inhibición de la vía de señalización de JNK.

En conjunto, estos datos sugieren que la inhibición de la activación de MMP-9 y de la degradación de laminina que induce metanfetamina no es suficiente para prevenir la neurotoxicidad sobre los terminales dopaminérgicos que induce la droga en el estriado del ratón.

### **Estudio de los cambios inducidos por metanfetamina sobre la presión arterial**

Diferentes autores han demostrado que la administración de metanfetamina aumenta la presión arterial de los animales tratados con la droga (Polesskaya et al., 2011; Wang et al., 2001). Ya que un



aumento en la presión arterial podría ser la causa de los cambios observados en la BHE (Mueller and Heistad, 1980; Nukhet Turkel and Ziya Ziylan, 2004), se midió la presión arterial en los ratones tratados con metanfetamina a diferentes tiempos durante el tratamiento. Como muestra la tabla 6, no se aprecia un incremento de la presión arterial en ninguno de los puntos analizados a lo largo del estudio. Esta discrepancia con los trabajos previos puede ser debida a que la dosis utilizada en nuestro estudio fue menor que las administradas por los otros grupos, y a los diferentes anestésicos utilizados. En nuestro estudio elegimos el uretano porque es el anestésico que menos influye en la presión sanguínea (Maggi and Meli, 1986).

Así pues, podemos concluir que los cambios observados sobre la permeabilidad de la BHE tras la administración de metanfetamina, no se deben a un incremento en la presión arterial.

# CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

1. La administración de dosis bajas y repetidas de metanfetamina produce un rápido y transitorio incremento en la expresión y actividad de MMP-9 que se asocia con un aumento en la degradación de laminina y una mayor permeabilidad de la BHE.
2. El incremento en la inmunoreactividad de IgG se localiza en áreas del estriado donde la actividad gelatinasa es más pronunciada.
3. Metanfetamina induce un incremento inmediato y de corta duración de la fosforilación de JNK1/2. Este efecto es atenuado por la administración conjunta de SP600125.
4. La administración de SP600125 previno los efectos de metanfetamina sobre la actividad de MMP-9, expresión de laminina e inmunoreactividad de IgG. Estos datos indican que la vía de señalización de JNK está implicada en los efectos *in vivo* de metanfetamina sobre la integridad de la lámina basal y de la BHE.
5. La administración de BB-94 previno la degradación de laminina y redujo las alteraciones en la permeabilidad de la BHE producidas por metanfetamina. Aunque BB-94 atenuó la hipertermia inducida por metanfetamina, sus efectos protectores no están relacionados con cambios en la temperatura corporal de los animales.

En conjunto, estos datos indican que la disminución en la integridad de la BHE que induce metanfetamina está mediada por la vía JNK que a su vez activa MMP-9 causando la degradación de laminina y la extravasación de IgG. La prevención de estos cambios no es suficiente para atenuar la neurotoxicidad dopaminérgica que induce la droga a largo plazo.

# BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, N. J., 2002. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat.* 200, 629-38.
- Abbott, N. J., 2004. Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. *Neurochem Int.* 45, 545-52.
- Abbott, N. J., 2005. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell Mol Neurobiol.* 25, 5-23.
- Abbott, N. J., et al., 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 37, 13-25.
- Abbott, N. J., et al., 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 7, 41-53.
- Abdul Muneer, P. M., et al., 2011. Impairment of brain endothelial glucose transporter by methamphetamine causes blood-brain barrier dysfunction. *Mol Neurodegener.* 6, 23.
- Abekawa, T., et al., 1994. Effects of repeated administration of a high dose of methamphetamine on dopamine and glutamate release in rat striatum and nucleus accumbens. *Brain Res.* 643, 276-81.
- Albers, D. S., Sonsalla, P. K., 1995. Methamphetamine-induced hyperthermia and dopaminergic neurotoxicity in mice: pharmacological profile of protective and nonprotective agents. *J Pharmacol Exp Ther.* 275, 1104-14.
- Albers, D. S., et al., 1996. Damage to dopaminergic nerve terminals in mice by combined treatment of intrastriatal malonate with systemic methamphetamine or MPTP. *Brain Res.* 718, 217-20.
- Albrecht, C., et al., 2005. A novel missense mutation in ABCA1 results in altered protein trafficking and reduced phosphatidylserine translocation in a patient with Scott syndrome. *Blood.* 106, 542-9.
- Ali, S. F., et al., 1994. Low environmental temperatures or pharmacologic agents that produce hypothermia decrease methamphetamine neurotoxicity in mice. *Brain Res.* 658, 33-8.
- Ali, S. F., et al., 1996. Methamphetamine-induced dopaminergic toxicity in mice. Role of environmental temperature and pharmacological agents. *Ann N Y Acad Sci.* 801, 187-98.
- Anderson, J. C., et al., 2008. New molecular targets in angiogenic vessels of glioblastoma tumours. *Expert Rev Mol Med.* 10, e23.
- Andreeva, A. Y., et al., 2001. Protein kinase C regulates the phosphorylation and cellular localization of occludin. *J Biol Chem.* 276, 38480-6.
- András, I. E., et al., 2005. Signaling mechanisms of HIV-1 Tat-induced alterations of claudin-5 expression in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 25, 1159-70.
- Ares-Santos, S., et al., 2012. Dopamine D(1) receptor deletion strongly reduces neurotoxic effects of methamphetamine. *Neurobiol Dis.* 45, 810-20.
- Armulik, A., et al., 2005. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res.* 97, 512-23.
- Asahi, M., et al., 2000. Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab.* 20, 1681-9.
- Asahi, M., et al., 2001. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci.* 21, 7724-32.
- Avison, M. J., et al., 2004. Neuroimaging correlates of HIV-associated BBB compromise. *J Neuroimmunol.* 157, 140-6.
- Açıkgöz, O., et al., 1998. Methamphetamine causes lipid peroxidation and an increase in superoxide dismutase activity in the rat striatum. *Brain Res.* 813, 200-2.
- Ballabh, P., et al., 2004. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis.* 16, 1-13.

- Bamforth, S. D., et al., 1999. A dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function. *J Cell Sci.* 112 ( Pt 12), 1879-88.
- Bartu, A., et al., 2009. Transfer of methylamphetamine and amphetamine into breast milk following recreational use of methylamphetamine. *Br J Clin Pharmacol.* 67, 455-9.
- Battaglia, G., et al., 2002. Selective blockade of mGlu5 metabotropic glutamate receptors is protective against methamphetamine neurotoxicity. *J Neurosci.* 22, 2135-41.
- Bauer, A. T., et al., 2010. Matrix metalloproteinase-9 mediates hypoxia-induced vascular leakage in the brain via tight junction rearrangement. *J Cereb Blood Flow Metab.* 30, 837-48.
- Bauer, B., et al., 2007. Tumor necrosis factor alpha and endothelin-1 increase P-glycoprotein expression and transport activity at the blood-brain barrier. *Mol Pharmacol.* 71, 667-75.
- Bazzoni, G., Dejana, E., 2004. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev.* 84, 869-901.
- Beckett, A. H., Rowland, M., 1965. Urinary excretion of methylamphetamine in man. *Nature.* 206, 1260-1.
- Begley, D. J., Brightman, M. W., 2003. Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Prog Drug Res.* 61, 39-78.
- Bernacki, J., et al., 2008. Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacol Rep.* 60, 600-22.
- Biedler, J. L., Riehm, H., 1970. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res.* 30, 1174-84.
- Boileau, I., et al., 2008. Increased vesicular monoamine transporter binding during early abstinence in human methamphetamine users: Is VMAT2 a stable dopamine neuron biomarker? *J Neurosci.* 28, 9850-6.
- Bonoiu, A., et al., 2009. MMP-9 gene silencing by a quantum dot-siRNA nanoplex delivery to maintain the integrity of the blood brain barrier. *Brain Res.* 1282, 142-55.
- Borst, P., Elferink, R. O., 2002. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem.* 71, 537-92.
- Bowyer, J. F., 1995. The role of hyperthermia in amphetamine's interactions with NMDA receptors, nitric oxide, and age to produce neurotoxicity. *Ann N Y Acad Sci.* 765, 309-10.
- Bowyer, J. F., Ali, S., 2006. High doses of methamphetamine that cause disruption of the blood-brain barrier in limbic regions produce extensive neuronal degeneration in mouse hippocampus. *Synapse.* 60, 521-32.
- Bowyer, J. F., et al., 1994. Further studies of the role of hyperthermia in methamphetamine neurotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther.* 268, 1571-80.
- Bowyer, J. F., et al., 2008. Neurotoxic-related changes in tyrosine hydroxylase, microglia, myelin, and the blood-brain barrier in the caudate-putamen from acute methamphetamine exposure. *Synapse.* 62, 193-204.
- Bradbury, m. W., et al., 1963. The distribution of potassium, sodium, chloride and urea between lumbar cerebrospinal fluid and blood serum in human subjects. *Clin sci.* 25, 97-105.
- Broening, H. W., et al., 2005. Interactions of dopamine D1 and D2 receptor antagonists with D-methamphetamine-induced hyperthermia and striatal dopamine and serotonin reductions. *Synapse.* 56, 84-93.
- Brown, J. M., et al., 2005. Methamphetamine-induced inhibition of mitochondrial complex II: roles of glutamate and peroxynitrite. *J Neurochem.* 95, 429-36.
- Brown, P. D., et al., 2004. Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. *Neuroscience.* 129, 957-70.
- Buffum, J. C., Shulgin, A. T., 2001. Overdose of 2.3 grams of intravenous methamphetamine: case, analysis and patient perspective. *J Psychoactive Drugs.* 33, 409-12.

- Burk, O., et al., 2005. Antimalarial artemisinin drugs induce cytochrome P450 and MDR1 expression by activation of xenosensors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Mol Pharmacol.* 67, 1954-65.
- Burrows, K. B., et al., 2000. Rapid and transient inhibition of mitochondrial function following methamphetamine or 3,4-methylenedioxymethamphetamine administration. *Eur J Pharmacol.* 398, 11-8.
- Cadet, J. L., Brannock, C., 1998. Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochem Int.* 32, 117-31.
- Cadet, J. L., et al., 1994. Attenuation of methamphetamine-induced neurotoxicity in copper/zinc superoxide dismutase transgenic mice. *J Neurochem.* 62, 380-3.
- Callaghan, R. C., et al., 2010. Incidence of Parkinson's disease among hospital patients with methamphetamine-use disorders. *Mov Disord.* 25, 2333-9.
- Callaghan, R. C., et al., 2012. Increased risk of Parkinson's disease in individuals hospitalized with conditions related to the use of methamphetamine or other amphetamine-type drugs. *Drug Alcohol Depend.* 120, 35-40.
- Callahan, B. T., et al., 2001. Inhibitors of Na(+)/H(+) and Na(+)/Ca(2+) exchange potentiate methamphetamine-induced dopamine neurotoxicity: possible role of ionic dysregulation in methamphetamine neurotoxicity. *J Neurochem.* 77, 1348-62.
- Cappon, G. D., et al., 1996. alpha-Phenyl-N-tert-butyl nitron attenuates methamphetamine-induced depletion of striatal dopamine without altering hyperthermia. *Synapse.* 24, 173-81.
- Cardoso, F. L., et al., 2010. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res Rev.* 64, 328-63.
- Cauwe, B., et al., 2007. The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 42, 113-85.
- Cervinski, M. A., et al., 2005. Psychoactive substrates stimulate dopamine transporter phosphorylation and down-regulation by cocaine-sensitive and protein kinase C-dependent mechanisms. *J Biol Chem.* 280, 40442-9.
- Chen, H. M., et al., 2007. Methamphetamine downregulates peroxiredoxins in rat pheochromocytoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 354, 96-101.
- Cheng, T., et al., 2006. Activated protein C inhibits tissue plasminogen activator-induced brain hemorrhage. *Nat Med.* 12, 1278-85.
- Choi, D. H., et al., 2008. A novel intracellular role of matrix metalloproteinase-3 during apoptosis of dopaminergic cells. *J Neurochem.* 106, 405-15.
- Citi, S., et al., 1988. Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. *Nature.* 333, 272-6.
- Conant, K., et al., 2011. Methamphetamine-associated cleavage of the synaptic adhesion molecule intercellular adhesion molecule-5. *J Neurochem.* 118, 521-32.
- Cook, C. E., et al., 1993. Pharmacokinetics of methamphetamine self-administered to human subjects by smoking S-(+)-methamphetamine hydrochloride. *Drug Metab Dispos.* 21, 717-23.
- Cook, C. E., et al., 1992. Pharmacokinetics of oral methamphetamine and effects of repeated daily dosing in humans. *Drug Metab Dispos.* 20, 856-62.
- Cruickshank, C. C., Dyer, K. R., 2009. A review of the clinical pharmacology of methamphetamine. *Addiction.* 104, 1085-99.
- Cubells, J. F., et al., 1994. Methamphetamine neurotoxicity involves vacuolation of endocytic organelles and dopamine-dependent intracellular oxidative stress. *J Neurosci.* 14, 2260-71.
- Cunningham, L. A., et al., 2005. Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia. *Glia.* 50, 329-39.

- Dascombe, M. J., et al., 1989. Pyrogenic and thermogenic effects of interleukin 1 beta in the rat. *Am J Physiol.* 256, E7-11.
- Davidson, C., et al., 2001. Methamphetamine neurotoxicity: necrotic and apoptotic mechanisms and relevance to human abuse and treatment. *Brain Res Brain Res Rev.* 36, 1-22.
- Dawson, T. M., Snyder, S. H., 1994. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci.* 14, 5147-59.
- De Vito, M. J., Wagner, G. C., 1989. Methamphetamine-induced neuronal damage: a possible role for free radicals. *Neuropharmacology.* 28, 1145-50.
- Del Maschio, A., et al., 1999. Leukocyte recruitment in the cerebrospinal fluid of mice with experimental meningitis is inhibited by an antibody to junctional adhesion molecule (JAM). *J Exp Med.* 190, 1351-6.
- Demeule, M., et al., 2001. Isolation of endothelial cells from brain, lung, and kidney: expression of the multidrug resistance P-glycoprotein isoforms. *Biochem Biophys Res Commun.* 281, 827-34.
- Deng, X., Cadet, J. L., 2000. Methamphetamine-induced apoptosis is attenuated in the striata of copper-zinc superoxide dismutase transgenic mice. *Brain Res Mol Brain Res.* 83, 121-4.
- Deng, X., et al., 2002. Mice with partial deficiency of c-Jun show attenuation of methamphetamine-induced neuronal apoptosis. *Mol Pharmacol.* 62, 993-1000.
- Deng, X., et al., 2007. Methamphetamine administration causes death of dopaminergic neurons in the mouse olfactory bulb. *Biol Psychiatry.* 61, 1235-43.
- Dore-Duffy, P., LaManna, J. C., 2007. Physiologic angiodynamics in the brain. *Antioxid Redox Signal.* 9, 1363-71.
- Doyle, D., 2005. Adolf Hitler's medical care. *J R Coll Physicians Edinb.* 35, 75-82.
- Earle, M. L., Davies, J. A., 1991. The effect of methamphetamine on the release of glutamate from striatal slices. *J Neural Transm Gen Sect.* 86, 217-22.
- El Khoury, J., et al., 2007. Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat Med.* 13, 432-8.
- ElAli, A., Hermann, D. M., 2010. Apolipoprotein E controls ATP-binding cassette transporters in the ischemic brain. *Sci Signal.* 3, ra72.
- Elali, A., Hermann, D. M., 2012. Liver X receptor activation enhances blood-brain barrier integrity in the ischemic brain and increases the abundance of ATP-binding cassette transporters ABCB1 and ABCC1 on brain capillary cells. *Brain Pathol.* 22, 175-87.
- Elali A, Urrutia A., Rubio-Araiz A, Hernandez-Jimenez M, Colado MI, Doeppner TR, Hermann DM, 2012. Apolipoprotein-E Controls Adenosine Triphosphate-Binding Cassette Transporters ABCB1 and ABCC1 on Cerebral Microvessels After Methamphetamine Intoxication. *Stroke.* 12, 600.
- Elkashef, A., et al., 2008. Pharmacotherapy of methamphetamine addiction: an update. *Subst Abus.* 29, 31-49.
- Farfel, G. M., Seiden, L. S., 1995. Role of hypothermia in the mechanism of protection against serotonergic toxicity. II. Experiments with methamphetamine, p-chloroamphetamine, fenfluramine, dizocilpine and dextromethorphan. *J Pharmacol Exp Ther.* 272, 868-75.
- Farkas, E., Luiten, P. G., 2001. Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.* 64, 575-611.
- Fenstermacher, J., et al., 1988. Structural and functional variations in capillary systems within the brain. *Ann N Y Acad Sci.* 529, 21-30.
- Fischer, J. F., Cho, A. K., 1979. Chemical release of dopamine from striatal homogenates: evidence for an exchange diffusion model. *J Pharmacol Exp Ther.* 208, 203-9.



- Fitzmaurice, P. S., et al., 2006. Levels of 4-hydroxynonenal and malondialdehyde are increased in brain of human chronic users of methamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther.* 319, 703-9.
- Fleckenstein, A. E., et al., 1997. Rapid and reversible effects of methamphetamine on dopamine transporters. *J Pharmacol Exp Ther.* 282, 834-8.
- Franksson, G., Anggård, E., 1970. The plasma protein binding of amphetamine, catecholamines and related compounds. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 28, 209-14.
- Freeman, L. R., Keller, J. N., 2012. Oxidative stress and cerebral endothelial cells: Regulation of the blood-brain-barrier and antioxidant based interventions. *Biochim Biophys Acta.* 1822, 822-9.
- Fukami, G., et al., 2004. Effect of antioxidant N-acetyl-L-cysteine on behavioral changes and neurotoxicity in rats after administration of methamphetamine. *Brain Res.* 1016, 90-5.
- Gasche, Y., et al., 1999. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J Cereb Blood Flow Metab.* 19, 1020-8.
- Gass, J. T., Olive, M. F., 2008. Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochem Pharmacol.* 75, 218-65.
- Gibb, J. W., Kogan, F. J., 1979. Influence of dopamine synthesis on methamphetamine-induced changes in striatal and adrenal tyrosine hydroxylase activity. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 310, 185-7.
- Gijbels, K., et al., 1994. Reversal of experimental autoimmune encephalomyelitis with a hydroxamate inhibitor of matrix metalloproteases. *J Clin Invest.* 94, 2177-82.
- Gingrich, M. B., et al., 2000. Potentiation of NMDA receptor function by the serine protease thrombin. *J Neurosci.* 20, 4582-95.
- Gingrich, M. B., Traynelis, S. F., 2000. Serine proteases and brain damage - is there a link? *Trends Neurosci.* 23, 399-407.
- Giovanni, A., et al., 1995. Estimating hydroxyl radical content in rat brain using systemic and intraventricular salicylate: impact of methamphetamine. *J Neurochem.* 64, 1819-25.
- Girouard, H., Iadecola, C., 2006. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J Appl Physiol.* 100, 328-35.
- González-Mariscal, L., et al., 2000. MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin Cell Dev Biol.* 11, 315-24.
- Gonçalves, J., et al., 2008. Methamphetamine-induced early increase of IL-6 and TNF- $\alpha$  mRNA expression in the mouse brain. *Ann N Y Acad Sci.* 1139, 103-11.
- Gottschall, P. E., Deb, S., 1996. Regulation of matrix metalloproteinase expressions in astrocytes, microglia and neurons. *Neuroimmunomodulation.* 3, 69-75.
- Gottschall, P. E., et al., 1995. Increased production of gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) and interleukin-6 by activated rat microglia in culture. *J Neurosci Res.* 42, 335-42.
- Grammas, P., et al., 2011. Cerebral microvascular endothelium and the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Expert Rev Mol Med.* 13, e19.
- Granado, N., et al., 2010. Selective vulnerability in striosomes and in the nigrostriatal dopaminergic pathway after methamphetamine administration : early loss of TH in striosomes after methamphetamine. *Neurotox Res.* 18, 48-58.
- Granado, N., et al., 2011a. Dopamine D2-receptor knockout mice are protected against dopaminergic neurotoxicity induced by methamphetamine or MDMA. *Neurobiol Dis.* 42, 391-403.
- Granado, N., et al., 2011b. Nrf2 deficiency potentiates methamphetamine-induced dopaminergic axonal damage and gliosis in the striatum. *Glia.* 59, 1850-63.

- Green, A. R., et al., 2004. Effect of ambient temperature and a prior neurotoxic dose of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on the hyperthermic response of rats to a single or repeated ('binge' ingestion) low dose of MDMA. *Psychopharmacology (Berl)*. 173, 264-9.
- Gu, Z., et al., 2005. A highly specific inhibitor of matrix metalloproteinase-9 rescues laminin from proteolysis and neurons from apoptosis in transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci*. 25, 6401-8.
- Gu, Z., et al., 2002. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science*. 297, 1186-90.
- Gunasekar, P. G., et al., 1995. NMDA receptor activation produces concurrent generation of nitric oxide and reactive oxygen species: implication for cell death. *J Neurochem*. 65, 2016-21.
- Halladay, A. K., et al., 2003. Relationship between methamphetamine-induced dopamine release, hyperthermia, self-injurious behaviour and long term dopamine depletion in BALB/c and C57BL/6 mice. *Pharmacol Toxicol*. 93, 33-41.
- Halliwell, B., 1999. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res*. 31, 261-72.
- Hamm, S., et al., 2004. Astrocyte mediated modulation of blood-brain barrier permeability does not correlate with a loss of tight junction proteins from the cellular contacts. *Cell Tissue Res*. 315, 157-66.
- Hansen, A. J., 1985. Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol Rev*. 65, 101-48.
- Hanson, G. R., et al., 2004. The methamphetamine experience: a NIDA partnership. *Neuropharmacology*. 47 Suppl 1, 92-100.
- Haorah, J., et al., 2007. Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *J Neurochem*. 101, 566-76.
- Harkness, K. A., et al., 2000. Dexamethasone regulation of matrix metalloproteinase expression in CNS vascular endothelium. *Brain*. 123 ( Pt 4), 698-709.
- Harris, D. S., et al., 2003. The bioavailability of intranasal and smoked methamphetamine. *Clin Pharmacol Ther*. 74, 475-86.
- Hart, C. L., et al., 2012. Is cognitive functioning impaired in methamphetamine users? A critical review. *Neuropsychopharmacology*. 37, 586-608.
- Hartz, A. M., et al., 2008. Diesel exhaust particles induce oxidative stress, proinflammatory signaling, and P-glycoprotein up-regulation at the blood-brain barrier. *FASEB J*. 22, 2723-33.
- Hashimoto, K., et al., 2004. Protective effects of N-acetyl-L-cysteine on the reduction of dopamine transporters in the striatum of monkeys treated with methamphetamine. *Neuropsychopharmacology*. 29, 2018-23.
- Hawkins, B. T., Davis, T. P., 2005. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev*. 57, 173-85.
- Hawkins, B. T., et al., 2007. Increased blood-brain barrier permeability and altered tight junctions in experimental diabetes in the rat: contribution of hyperglycaemia and matrix metalloproteinases. *Diabetologia*. 50, 202-11.
- Hebert, M. A., O'Callaghan, J. P., 2000. Protein phosphorylation cascades associated with methamphetamine-induced glial activation. *Ann N Y Acad Sci*. 914, 238-62.
- Hellström, M., et al., 2001. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol*. 153, 543-53.
- Heo, J. H., et al., 1999. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 19, 624-33.
- Hermann, D. M., Bassetti, C. L., 2007. Implications of ATP-binding cassette transporters for brain pharmacotherapies. *Trends Pharmacol Sci*. 28, 128-34.

- Hermann, D. M., et al., 2006. Role of drug efflux carriers in the healthy and diseased brain. *Ann Neurol.* 60, 489-98.
- Herron, G. S., et al., 1986. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. II. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors. *J Biol Chem.* 261, 2814-8.
- Higgins, C. F., Linton, K. J., 2004. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol.* 11, 918-26.
- Hirase, T., et al., 2001. Regulation of tight junction permeability and occludin phosphorylation by Rhoa-p160ROCK-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem.* 276, 10423-31.
- Hirata, H., et al., 1996. Autoradiographic evidence for methamphetamine-induced striatal dopaminergic loss in mouse brain: attenuation in CuZn-superoxide dismutase transgenic mice. *Brain Res.* 714, 95-103.
- Ho, E. L., et al., 2009. Cerebrovascular complications of methamphetamine abuse. *Neurocrit Care.* 10, 295-305.
- Huestis, M. A., Cone, E. J., 2007. Methamphetamine disposition in oral fluid, plasma, and urine. *Ann N Y Acad Sci.* 1098, 104-21.
- Hunot, S., et al., 2004. JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 665-70.
- Imam, S. Z., et al., 2001a. Methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity: role of peroxynitrite and neuroprotective role of antioxidants and peroxynitrite decomposition catalysts. *Ann N Y Acad Sci.* 939, 366-80.
- Imam, S. Z., et al., 1999. Selenium, an antioxidant, protects against methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. *Brain Res.* 818, 575-8.
- Imam, S. Z., et al., 2001b. Peroxynitrite plays a role in methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity: evidence from mice lacking neuronal nitric oxide synthase gene or overexpressing copper-zinc superoxide dismutase. *J Neurochem.* 76, 745-9.
- Itzhak, Y., Ali, S. F., 1996. The neuronal nitric oxide synthase inhibitor, 7-nitroindazole, protects against methamphetamine-induced neurotoxicity in vivo. *J Neurochem.* 67, 1770-3.
- Itzhak, Y., et al., 1998a. Resistance of neuronal nitric oxide synthase-deficient mice to methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther.* 284, 1040-7.
- Itzhak, Y., et al., 1998b. Effect of melatonin on methamphetamine- and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurotoxicity and methamphetamine-induced behavioral sensitization. *Neuropharmacology.* 37, 781-91.
- Ilzecka, J., 1996. The structure and function of blood-brain barrier in ischaemic brain stroke process. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med.* 51, 123-7.
- Jacobs, S., Doering, L. C., 2010. Astrocytes prevent abnormal neuronal development in the fragile x mouse. *J Neurosci.* 30, 4508-14.
- Jayanthi, S., et al., 2005. Calcineurin/NFAT-induced up-regulation of the Fas ligand/Fas death pathway is involved in methamphetamine-induced neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 868-73.
- Jayanthi, S., et al., 1998. Methamphetamine-induced changes in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in copper/zinc-superoxide dismutase transgenic mice. *Ann N Y Acad Sci.* 844, 92-102.
- Jeng, W., et al., 2006. Prostaglandin H synthase-catalyzed bioactivation of amphetamines to free radical intermediates that cause CNS regional DNA oxidation and nerve terminal degeneration. *FASEB J.* 20, 638-50.

- Jeong, S. M., et al., 2006. Changes in magnesium concentration in the serum and cerebrospinal fluid of neuropathic rats. *Acta Anaesthesiol Scand.* 50, 211-6.
- Kalivas, P. W., Duffy, P., 1997. Dopamine regulation of extracellular glutamate in the nucleus accumbens. *Brain Res.* 761, 173-7.
- Karler, R., et al., 1989. Blockade of "reverse tolerance" to cocaine and amphetamine by MK-801. *Life Sci.* 45, 599-606.
- Kieseier, B. C., et al., 1999. Matrix metalloproteinases in inflammatory demyelination: targets for treatment. *Neurology.* 53, 20-5.
- Kim, E. K., Choi, E. J., 2010. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta.* 1802, 396-405.
- Kim, Y. S., et al., 2005. Matrix metalloproteinase-3: a novel signaling proteinase from apoptotic neuronal cells that activates microglia. *J Neurosci.* 25, 3701-11.
- Kirk, J., et al., 2003. Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood-brain barrier leakage and active demyelination. *J Pathol.* 201, 319-27.
- Kish, S. J., et al., 2009. Brain serotonin transporter in human methamphetamine users. *Psychopharmacology (Berl).* 202, 649-61.
- Kita, T., et al., 2000. Methamphetamine-induced striatal dopamine release, behavior changes and neurotoxicity in BALB/c mice. *Int J Dev Neurosci.* 18, 521-30.
- Kita, T., et al., 1999. Hydroxyl radical formation following methamphetamine administration to rats. *Pharmacol Toxicol.* 85, 133-7.
- Kita, T., et al., 2003. Current research on methamphetamine-induced neurotoxicity: animal models of monoamine disruption. *J Pharmacol Sci.* 92, 178-95.
- Kita, T., et al., 1995. Effects of pargyline and pyrogallol on the methamphetamine-induced dopamine depletion. *Mol Chem Neuropathol.* 24, 31-41.
- Kiyatkin, E. A., Sharma, H. S., 2009. Acute methamphetamine intoxication: brain hyperthermia, blood-brain barrier, brain edema, and morphological cell abnormalities. *Int Rev Neurobiol.* 88, 65-100.
- Kleiner, D. E., Stetler-Stevenson, W. G., 1994. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem.* 218, 325-9.
- Koda, L. Y., Gibb, J. W., 1973. Adrenal and striatal tyrosine hydroxylase activity after methamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther.* 185, 42-8.
- Kogan, F. J., et al., 1976. Influence of methamphetamine on nigral and striatal tyrosine hydroxylase activity and on striatal dopamine levels. *Eur J Pharmacol.* 36, 363-71.
- Kondo, T., et al., 1994. Bromocriptine scavenges methamphetamine-induced hydroxyl radicals and attenuates dopamine depletion in mouse striatum. *Ann N Y Acad Sci.* 738, 222-9.
- Krasnova, I. N., Cadet, J. L., 2009. Methamphetamine toxicity and messengers of death. *Brain Res Rev.* 60, 379-407.
- Kuhn, D. M., et al., 1999. Tyrosine hydroxylase is inactivated by catechol-quinones and converted to a redox-cycling quinoprotein: possible relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem.* 73, 1309-17.
- Kushnareva, Y. E., et al., 2005. Excitotoxic injury to mitochondria isolated from cultured neurons. *J Biol Chem.* 280, 28894-902.
- Kyriakides, T. R., Bornstein, P., 2003. Extracellular proteins as modulators of wound healing and the foreign body response. *Thromb Haemost.* 90, 986-92.
- Ladenheim, B., et al., 2000. Methamphetamine-induced neurotoxicity is attenuated in transgenic mice with a null mutation for interleukin-6. *Mol Pharmacol.* 58, 1247-56.

- Larsen, K. E., et al., 2002. Methamphetamine-induced degeneration of dopaminergic neurons involves autophagy and upregulation of dopamine synthesis. *J Neurosci.* 22, 8951-60.
- LaVoie, M. J., Hastings, T. G., 1999. Dopamine quinone formation and protein modification associated with the striatal neurotoxicity of methamphetamine: evidence against a role for extracellular dopamine. *J Neurosci.* 19, 1484-91.
- Lazzeri, G., et al., 2007. Mechanisms involved in the formation of dopamine-induced intracellular bodies within striatal neurons. *J Neurochem.* 101, 1414-27.
- Lee, G., et al., 2001. Functional expression of P-glycoprotein in rat brain microglia. *J Pharmacol Exp Ther.* 299, 204-12.
- Lee, S. W., et al., 2003. SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nat Med.* 9, 900-6.
- Leon, L. R., 2002. Invited review: cytokine regulation of fever: studies using gene knockout mice. *J Appl Physiol.* 92, 2648-55.
- Leslie, E. M., et al., 2005. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol.* 204, 216-37.
- Li, X., et al., 2008. Proteomic profiling of proteins associated with methamphetamine-induced neurotoxicity in different regions of rat brain. *Neurochem Int.* 52, 256-64.
- Li, Y., Trush, M. A., 1993. DNA damage resulting from the oxidation of hydroquinone by copper: role for a Cu(II)/Cu(I) redox cycle and reactive oxygen generation. *Carcinogenesis.* 14, 1303-11.
- Liang, K. C., et al., 2007. Interleukin-1 $\beta$  induces MMP-9 expression via p42/p44 MAPK, p38 MAPK, JNK, and nuclear factor-kappaB signaling pathways in human tracheal smooth muscle cells. *J Cell Physiol.* 211, 759-70.
- Lin, L. Y., et al., 1997. Oxidation of methamphetamine and methylenedioxymethamphetamine by CYP2D6. *Drug Metab Dispos.* 25, 1059-64.
- Lindberg, R. L., et al., 2001. The expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in lesions and normal appearing white matter of multiple sclerosis. *Brain.* 124, 1743-53.
- Liu, Y., et al., 2008. Relationship between methamphetamine exposure and matrix metalloproteinase 9 expression. *Neuroreport.* 19, 1407-9.
- Lowry, O. H., et al., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265-75.
- Löscher, W., Potschka, H., 2005. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci.* 6, 591-602.
- Maggi, C. A., Meli, A., 1986. Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 2: Cardiovascular system. *Experientia.* 42, 292-7.
- Magnoni, S., et al., 2004. Differential alterations in the expression and activity of matrix metalloproteinases 2 and 9 after transient cerebral ischemia in mice. *Neurobiol Dis.* 17, 188-97.
- Man, S., et al., 2007. Inflammatory cell migration into the central nervous system: a few new twists on an old tale. *Brain Pathol.* 17, 243-50.
- Mandell, A. J., Morgan, M., 1970. Amphetamine induced increase in tyrosine hydroxylase activity. *Nature.* 227, 75-6.
- Mark, K. A., et al., 2007. Dynamic changes in vesicular glutamate transporter 1 function and expression related to methamphetamine-induced glutamate release. *J Neurosci.* 27, 6823-31.
- Mark, K. A., et al., 2004. High-dose methamphetamine acutely activates the striatonigral pathway to increase striatal glutamate and mediate long-term dopamine toxicity. *J Neurosci.* 24, 11449-56.

- Markesbery, W. R., Lovell, M. A., 1998. Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 19, 33-6.
- Martins, T., et al., 2011. Methamphetamine transiently increases the blood-brain barrier permeability in the hippocampus: role of tight junction proteins and matrix metalloproteinase-9. *Brain Res*. 1411, 28-40.
- Martínez-Mir, A., et al., 1998. Retinitis pigmentosa caused by a homozygous mutation in the Stargardt disease gene ABCR. *Nat Genet*. 18, 11-2.
- McCann, U. D., et al., 2008. Persistent cognitive and dopamine transporter deficits in abstinent methamphetamine users. *Synapse*. 62, 91-100.
- McCann, U. D., et al., 1998. Reduced striatal dopamine transporter density in abstinent methamphetamine and methcathinone users: evidence from positron emission tomography studies with [<sup>11</sup>C]WIN-35,428. *J Neurosci*. 18, 8417-22.
- McCarthy, K. M., et al., 1996. Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci*. 109 ( Pt 9), 2287-98.
- McColl, B. W., et al., 2008. Systemic inflammation alters the kinetics of cerebrovascular tight junction disruption after experimental stroke in mice. *J Neurosci*. 28, 9451-62.
- Melega, W. P., et al., 2007. Methamphetamine increases basal ganglia iron to levels observed in aging. *Neuroreport*. 18, 1741-5.
- Mendelson, J., et al., 1995. Methamphetamine and ethanol interactions in humans. *Clin Pharmacol Ther*. 57, 559-68.
- Meng, Q., et al., 2012. Hyperthermia worsens ischaemic brain injury through destruction of microvessels in an embolic model in rats. *Int J Hyperthermia*. 28, 24-32.
- Merrill, J. E., Murphy, S. P., 1997. Inflammatory events at the blood brain barrier: regulation of adhesion molecules, cytokines, and chemokines by reactive nitrogen and oxygen species. *Brain Behav Immun*. 11, 245-63.
- Milhorat, T. H., et al., 1971. Cerebrospinal fluid production by the choroid plexus and brain. *Science*. 173, 330-2.
- Miller, D. B., O'Callaghan, J. P., 1994. Environment-, drug- and stress-induced alterations in body temperature affect the neurotoxicity of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J Pharmacol Exp Ther*. 270, 752-60.
- Miller, D. B., O'Callaghan, J. P., 2003. Elevated environmental temperature and methamphetamine neurotoxicity. *Environ Res*. 92, 48-53.
- Minagar, A., Alexander, J. S., 2003. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 9, 540-9.
- Miyazaki, I., et al., 2006. Methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity is regulated by quinone-formation-related molecules. *FASEB J*. 20, 571-3.
- Mizoguchi, H., et al., 2007. Role of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of MMP in methamphetamine-induced behavioral sensitization and reward: implications for dopamine receptor down-regulation and dopamine release. *J Neurochem*. 102, 1548-60.
- Montaner, J., et al., 2001. Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. *Stroke*. 32, 2762-7.
- Montine, T. J., et al., 1997. Neurotoxicity of endogenous cysteinylcatechols. *Exp Neurol*. 148, 26-33.
- Morgan, L., et al., 2007. Inflammation and dephosphorylation of the tight junction protein occludin in an experimental model of multiple sclerosis. *Neuroscience*. 147, 664-73.
- Morganti-Kossmann, M. C., et al., 2002. Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care*. 8, 101-5.

- Mueller, S. M., Heistad, D. D., 1980. Effect of chronic hypertension on the blood-brain barrier. *Hypertension*. 2, 809-12.
- Mulligan, S. J., MacVicar, B. A., 2004. Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature*. 431, 195-9.
- Mun-Bryce, S., Rosenberg, G. A., 1998. Gelatinase B modulates selective opening of the blood-brain barrier during inflammation. *Am J Physiol*. 274, R1203-11.
- Nadal, A., et al., 1995. Plasma albumin is a potent trigger of calcium signals and DNA synthesis in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92, 1426-30.
- Nagase, H., 1997. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem*. 378, 151-60.
- Nash, J. F., Yamamoto, B. K., 1992. Methamphetamine neurotoxicity and striatal glutamate release: comparison to 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Brain Res*. 581, 237-43.
- Neuhaus, J., et al., 1991. Induction of blood-brain barrier characteristics in bovine brain endothelial cells by rat astroglial cells in transfilter coculture. *Ann N Y Acad Sci*. 633, 578-80.
- Newton, T. F., et al., 2004. Methamphetamine abstinence syndrome: preliminary findings. *Am J Addict*. 13, 248-55.
- Nischwitz, V., et al., 2008. Speciation analysis of selected metals and determination of their total contents in paired serum and cerebrospinal fluid samples: An approach to investigate the permeability of the human blood-cerebrospinal fluid-barrier. *Anal Chim Acta*. 627, 258-69.
- Nitta, T., et al., 2003. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol*. 161, 653-60.
- Nukhet Turkel, A., Ziya Ziylan, Y., 2004. Protection of blood-brain barrier breakdown by nifedipine in adrenaline-induced acute hypertension. *Int J Neurosci*. 114, 517-28.
- Numachi, Y., et al., 2007. Methamphetamine-induced hyperthermia and lethal toxicity: role of the dopamine and serotonin transporters. *Eur J Pharmacol*. 572, 120-8.
- Nwaozuzu, O. M., et al., 2003. Signalling pathways influencing basal and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced P-glycoprotein expression in endothelial cells derived from the blood-brain barrier. *J Neurochem*. 87, 1043-51.
- O'Dell, S. J., et al., 1991. Multiple methamphetamine injections induce marked increases in extracellular striatal dopamine which correlate with subsequent neurotoxicity. *Brain Res*. 564, 256-60.
- O'Dell, S. J., et al., 1993. Methamphetamine-induced dopamine overflow and injury to striatal dopamine terminals: attenuation by dopamine D1 or D2 antagonists. *J Neurochem*. 60, 1792-9.
- Oh, L. Y., et al., 1999. Matrix metalloproteinase-9/gelatinase B is required for process outgrowth by oligodendrocytes. *J Neurosci*. 19, 8464-75.
- Oldendorf, W. H., et al., 1977. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol*. 1, 409-17.
- Orlowski, S., et al., 2006. P-glycoprotein and 'lipid rafts': some ambiguous mutual relationships (floating on them, building them or meeting them by chance?). *Cell Mol Life Sci*. 63, 1038-59.
- Pacher, P., et al., 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 87, 315-424.
- Palmer, A. M., 2010. The role of the blood-CNS barrier in CNS disorders and their treatment. *Neurobiol Dis*. 37, 3-12.
- Pan, J., et al., 2007. Expression of FasL and its interaction with Fas are mediated by c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway in 6-OHDA-induced rat model of Parkinson disease. *Neurosci Lett*. 428, 82-7.

- Pardridge, W. M., 2007. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov Today*. 12, 54-61.
- Pardridge, W. M., et al., 1997. Brain microvascular and astrocyte localization of P-glycoprotein. *J Neurochem*. 68, 1278-85.
- Parks, W. C., et al., 2004. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 4, 617-29.
- Peng, J., et al., 2004. The herbicide paraquat induces dopaminergic nigral apoptosis through sustained activation of the JNK pathway. *J Biol Chem*. 279, 32626-32.
- Peppiatt, C. M., et al., 2006. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*. 443, 700-4.
- Perez-Reyes, M., et al., 1991. Clinical effects of methamphetamine vapor inhalation. *Life Sci*. 49, 953-9.
- Persidsky, Y., Gendelman, H. E., 2003. Mononuclear phagocyte immunity and the neuropathogenesis of HIV-1 infection. *J Leukoc Biol*. 74, 691-701.
- Persidsky, Y., et al., 2006. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol*. 1, 223-36.
- Piontek, J., et al., 2008. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J*. 22, 146-58.
- Plotnikov, A., et al., 2011. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta*. 1813, 1619-33.
- Polesskaya, O., et al., 2011. Methamphetamine causes sustained depression in cerebral blood flow. *Brain Res*. 1373, 91-100.
- Potashkin, J. A., Meredith, G. E., 2006. The role of oxidative stress in the dysregulation of gene expression and protein metabolism in neurodegenerative disease. *Antioxid Redox Signal*. 8, 144-51.
- Pu, H., et al., 2007. Limited role of COX-2 in HIV Tat-induced alterations of tight junction protein expression and disruption of the blood-brain barrier. *Brain Res*. 1184, 333-44.
- Ramirez, S. H., et al., 2009. Methamphetamine disrupts blood-brain barrier function by induction of oxidative stress in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab*. 29, 1933-45.
- Rao, R. K., et al., 2002. Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *Biochem J*. 368, 471-81.
- Reagan-Shaw, S., et al., 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 22, 659-61.
- Reese, T. S., Karnovsky, M. J., 1967. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol*. 34, 207-17.
- Reiber, H., 2001. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta*. 310, 173-86.
- Rivière, G. J., et al., 2000. Disposition of methamphetamine and its metabolite amphetamine in brain and other tissues in rats after intravenous administration. *J Pharmacol Exp Ther*. 292, 1042-7.
- Rosenberg, G. A., 2002. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia*. 39, 279-91.
- Rosenberg, G. A., 2009. Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol*. 8, 205-16.
- Rosenberg, G. A., et al., 2007. Effect of synthetic matrix metalloproteinase inhibitors on lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier opening in rodents: Differences in response based on strains and solvents. *Brain Res*. 1133, 186-92.
- Rosenberg, G. A., et al., 1996. Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 16, 360-6.



- Rosenberg, G. A., Yang, Y., 2007. Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurg Focus.* 22, E4.
- Rubin, L. L., et al., 1991. Differentiation of brain endothelial cells in cell culture. *Ann N Y Acad Sci.* 633, 420-5.
- Saitou, M., et al., 2000. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell.* 11, 4131-42.
- Sakakibara, A., et al., 1997. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol.* 137, 1393-401.
- Sanchez, V., et al., 2004. Effect of repeated ('binge') dosing of MDMA to rats housed at normal and high temperature on neurotoxic damage to cerebral 5-HT and dopamine neurones. *J Psychopharmacol.* 18, 412-6.
- Sanchez, V., et al., 2003. The nNOS inhibitor, AR-R17477AR, prevents the loss of NF68 immunoreactivity induced by methamphetamine in the mouse striatum. *J Neurochem.* 85, 515-24.
- Sattler, R., et al., 2000. Distinct roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in excitotoxicity. *J Neurosci.* 20, 22-33.
- Saunders, C., et al., 2000. Amphetamine-induced loss of human dopamine transporter activity: an internalization-dependent and cocaine-sensitive mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 6850-5.
- Schaeffer, H. J., Weber, M. J., 1999. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol.* 19, 2435-44.
- Schep, L. J., et al., 2010. The clinical toxicology of metamfetamine. *Clin Toxicol (Phila).* 48, 675-94.
- Schep, L. J., et al., 2011. The clinical toxicology of the designer "party pills" benzylpiperazine and trifluoromethylphenylpiperazine. *Clin Toxicol (Phila).* 49, 131-41.
- Schinkel, A. H., et al., 1994. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell.* 77, 491-502.
- Schinkel, A. H., et al., 1996. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest.* 97, 2517-24.
- Schinkel, A. H., et al., 1995. Absence of the *mdr1a* P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest.* 96, 1698-705.
- Schmidt, C. J., et al., 1985. Role of dopamine in the neurotoxic effects of methamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther.* 233, 539-44.
- Schmitz, Y., et al., 2001. Amphetamine distorts stimulation-dependent dopamine overflow: effects on D2 autoreceptors, transporters, and synaptic vesicle stores. *J Neurosci.* 21, 5916-24.
- Schulz, E., et al., 2008. Suppression of the JNK pathway by induction of a metabolic stress response prevents vascular injury and dysfunction. *Circulation.* 118, 1347-57.
- Schulze, C., Firth, J. A., 1993. Immunohistochemical localization of adherens junction components in blood-brain barrier microvessels of the rat. *J Cell Sci.* 104 ( Pt 3), 773-82.
- Sedlakova, R., et al., 1999. Ultrastructure of the blood-brain barrier in the rabbit. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 31, 149-61.
- Seegers, U., et al., 2002. Transient increase of P-glycoprotein expression in endothelium and parenchyma of limbic brain regions in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 51, 257-68.
- Segal, D. S., et al., 2003. Escalating dose methamphetamine pretreatment alters the behavioral and neurochemical profiles associated with exposure to a high-dose methamphetamine binge. *Neuropsychopharmacology.* 28, 1730-40.

- Seiden, L. S., et al., 1993. Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 33, 639-77.
- Sekine, Y., et al., 2008. Methamphetamine causes microglial activation in the brains of human abusers. *J Neurosci.* 28, 5756-61.
- Sharma, H. S., Ali, S. F., 2006. Alterations in blood-brain barrier function by morphine and methamphetamine. *Ann N Y Acad Sci.* 1074, 198-224.
- Sharom, F. J., et al., 2005. New insights into the drug binding, transport and lipid flippase activities of the p-glycoprotein multidrug transporter. *J Bioenerg Biomembr.* 37, 481-7.
- Shimosato, K., et al., 1988. Biphasic effects of alcohol drinking on methamphetamine metabolism in man. *Alcohol Alcohol.* 23, 351-7.
- Shoblock, J. R., et al., 2003. Neurochemical and behavioral differences between d-methamphetamine and d-amphetamine in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 165, 359-69.
- Shulman, R. G., et al., 2004. Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging. *Trends Neurosci.* 27, 489-95.
- Smit, J. W., et al., 1999. Absence or pharmacological blocking of placental P-glycoprotein profoundly increases fetal drug exposure. *J Clin Invest.* 104, 1441-7.
- Snoek-van Beurden, P. A., Von den Hoff, J. W., 2005. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques.* 38, 73-83.
- Snyder, G. L., et al., 2000. Regulation of phosphorylation of the GluR1 AMPA receptor in the neostriatum by dopamine and psychostimulants in vivo. *J Neurosci.* 20, 4480-8.
- Sokolov, B. P., Cadet, J. L., 2006. Methamphetamine causes alterations in the MAP kinase-related pathways in the brains of mice that display increased aggressiveness. *Neuropsychopharmacology.* 31, 956-66.
- Sokolov, B. P., et al., 2004. Chronic methamphetamine increases fighting in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 77, 319-26.
- Sonsalla, P. K., et al., 1998. Role of glutamate in neurodegeneration of dopamine neurons in several animal models of parkinsonism. *Amino Acids.* 14, 69-74.
- Sonsalla, P. K., et al., 1986. Nigrostriatal dopamine actions on the D2 receptors mediate methamphetamine effects on the striatonigral substance P system. *Neuropharmacology.* 25, 1221-30.
- Sonsalla, P. K., et al., 1996. Treatment of mice with methamphetamine produces cell loss in the substantia nigra. *Brain Res.* 738, 172-5.
- Sonsalla, P. K., et al., 1989. Role for excitatory amino acids in methamphetamine-induced nigrostriatal dopaminergic toxicity. *Science.* 243, 398-400.
- Soontornmalai, A., et al., 2006. Differential, strain-specific cellular and subcellular distribution of multidrug transporters in murine choroid plexus and blood-brain barrier. *Neuroscience.* 138, 159-69.
- Sozen, T., et al., 2009. Role of interleukin-1beta in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in mice. *Stroke.* 40, 2519-25.
- Spencer, J. P., et al., 2002. 5-s-Cysteinylyl-conjugates of catecholamines induce cell damage, extensive DNA base modification and increases in caspase-3 activity in neurons. *J Neurochem.* 81, 122-9.
- Sprague, J. E., et al., 2004. UCP3 and thyroid hormone involvement in methamphetamine-induced hyperthermia. *Biochem Pharmacol.* 68, 1339-43.
- Springman, E. B., et al., 1990. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87, 364-8.

- Stamatovic, S. M., et al., 2005. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab.* 25, 593-606.
- Stamenkovic, I., 2003. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol.* 200, 448-64.
- Stephans, S. E., et al., 1998. Substrates of energy metabolism attenuate methamphetamine-induced neurotoxicity in striatum. *J Neurochem.* 71, 613-21.
- Stephans, S. E., Yamamoto, B. K., 1994. Methamphetamine-induced neurotoxicity: roles for glutamate and dopamine efflux. *Synapse.* 17, 203-9.
- Sternlicht, M. D., Werb, Z., 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17, 463-516.
- Stewart, J. L., Meeker, J. E., 1997. Fetal and infant deaths associated with maternal methamphetamine abuse. *J Anal Toxicol.* 21, 515-7.
- Sulzer, D., et al., 2005. Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Prog Neurobiol.* 75, 406-33.
- Suzuki, O., et al., 1980. Inhibition of monoamine oxidase by d-methamphetamine. *Biochem Pharmacol.* 29, 2071-3.
- Sánchez, C., 1989. The effects of dopamine D-1 and D-2 receptor agonists on body temperature in male mice. *Eur J Pharmacol.* 171, 201-6.
- Takeichi, M., 1995. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol.* 7, 619-27.
- Takenaga, Y., et al., 2009. Inhibition of Src activity decreases tyrosine phosphorylation of occludin in brain capillaries and attenuates increase in permeability of the blood-brain barrier after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 29, 1099-108.
- Tanti, J. F., Jager, J., 2009. Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr Opin Pharmacol.* 9, 753-62.
- Thomas, D. M., et al., 2008. The newly synthesized pool of dopamine determines the severity of methamphetamine-induced neurotoxicity. *J Neurochem.* 105, 605-16.
- Thrash, B., et al., 2009. Methamphetamine-induced neurotoxicity: the road to Parkinson's disease. *Pharmacol Rep.* 61, 966-77.
- van Helvoort, A., et al., 1996. MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell.* 87, 507-17.
- Van Wart, H. E., Birkedal-Hansen, H., 1990. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87, 5578-82.
- Venton, B. J., et al., 2003. Real-time decoding of dopamine concentration changes in the caudate-putamen during tonic and phasic firing. *J Neurochem.* 87, 1284-95.
- Visse, R., Nagase, H., 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 92, 827-39.
- Vogelgesang, S., et al., 2004. The role of P-glycoprotein in cerebral amyloid angiopathy; implications for the early pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 1, 121-5.
- Volkow, N. D., et al., 2001. Association of dopamine transporter reduction with psychomotor impairment in methamphetamine abusers. *Am J Psychiatry.* 158, 377-82.
- Vu, T. H., et al., 1998. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell.* 93, 411-22.
- Wagner, G. C., et al., 1985. Pretreatment with ascorbic acid attenuates the neurotoxic effects of methamphetamine in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 47, 221-8.

- Wagner, G. C., et al., 1983. Alpha-methyltyrosine attenuates and reserpine increases methamphetamine-induced neuronal changes. *Brain Res.* 270, 285-8.
- Wagner, G. C., et al., 1980. Long-lasting depletions of striatal dopamine and loss of dopamine uptake sites following repeated administration of methamphetamine. *Brain Res.* 181, 151-60.
- Wagner, J., Peroutka, S. J., 1990. Neurochemistry and neurotoxicity of substituted amphetamines. *Neuropsychopharmacology.* 3, 219-20.
- Wang, Q., Beck, W. T., 1998. Transcriptional suppression of multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression by wild-type p53. *Cancer Res.* 58, 5762-9.
- Wang, Y., et al., 2001. Methamphetamine potentiates ischemia/reperfusion insults after transient middle cerebral artery ligation. *Stroke.* 32, 775-82.
- Whitehead, R. E., et al., 2001. Reaction of oxidized dopamine with endogenous cysteine residues in the human dopamine transporter. *J Neurochem.* 76, 1242-51.
- Wijnholds, J., et al., 2000. Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and contributes to the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J Clin Invest.* 105, 279-85.
- Wijnholds, J., et al., 1997. Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein. *Nat Med.* 3, 1275-9.
- Wilson, J. M., et al., 1996. Striatal dopamine nerve terminal markers in human, chronic methamphetamine users. *Nat Med.* 2, 699-703.
- Wise, R. A., 2009. Roles for nigrostriatal--not just mesocorticolimbic--dopamine in reward and addiction. *Trends Neurosci.* 32, 517-24.
- Wolburg, H., et al., 2009. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res.* 335, 75-96.
- Wolburg, H., et al., 2003. Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol.* 105, 586-92.
- Wright, J. W., Harding, J. W., 2009. Contributions of matrix metalloproteinases to neural plasticity, habituation, associative learning and drug addiction. *Neural Plast.* 2009, 579382.
- Wu, C. W., et al., 2007. Enhanced oxidative stress and aberrant mitochondrial biogenesis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells during methamphetamine induced apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 220, 243-51.
- Wu, C. Y., et al., 2009a. IL-1 $\beta$  induces MMP-9 expression via a Ca<sup>2+</sup>-dependent CaMKII/JNK/c-JUN cascade in rat brain astrocytes. *Glia.* 57, 1775-89.
- Xie, T., et al., 2000. Effect of temperature on dopamine transporter function and intracellular accumulation of methamphetamine: implications for methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. *J Neurosci.* 20, 7838-45.
- Yamamoto, B. K., et al., 2010. Amphetamine toxicities: classical and emerging mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.* 1187, 101-21.
- Yamamoto, B. K., Zhu, W., 1998. The effects of methamphetamine on the production of free radicals and oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther.* 287, 107-14.
- Yang, Y., et al., 2007. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 27, 697-709.
- Yin, K. J., et al., 2006. Matrix metalloproteinases expressed by astrocytes mediate extracellular amyloid-beta peptide catabolism. *J Neurosci.* 26, 10939-48.
- Yoon, S., Seger, R., 2006. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors.* 24, 21-44.
- Yoshimura, K., et al., 2005. Regression of abdominal aortic aneurysm by inhibition of c-Jun N-terminal kinase. *Nat Med.* 11, 1330-8.

- Yuan, J., et al., 2001. Evidence against an essential role of endogenous brain dopamine in methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. *J Neurochem.* 77, 1338-47.
- Zafar, K. S., et al., 2006. A potential role for cyclized quinones derived from dopamine, DOPA, and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in proteasomal inhibition. *Mol Pharmacol.* 70, 1079-86.
- Zarkovic, K., 2003. 4-hydroxynonenal and neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Med.* 24, 293-303.
- Zarrindast, M. R., Tabatabai, S. A., 1992. Involvement of dopamine receptor subtypes in mouse thermoregulation. *Psychopharmacology (Berl).* 107, 341-6.
- Zenker, D., et al., 2003. Human blood-derived macrophages enhance barrier function of cultured primary bovine and human brain capillary endothelial cells. *J Physiol.* 551, 1023-32.
- Zhang, K., Kaufman, R. J., 2008. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature.* 454, 455-62.
- Zhang, Y., et al., 1999. Tissue oxygen levels control astrocyte movement and differentiation in developing retina. *Brain Res Dev Brain Res.* 118, 135-45.
- Zhong, Y., et al., 1993. Monoclonal antibody 7H6 reacts with a novel tight junction-associated protein distinct from ZO-1, cingulin and ZO-2. *J Cell Biol.* 120, 477-83.
- Zhou, J., et al., 2011. Thrombopoietin protects the brain and improves sensorimotor functions: reduction of stroke-induced MMP-9 upregulation and blood-brain barrier injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 31, 924-33.
- Zhou, J., et al., 2006. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in cancer cells by the c-Jun NH2-terminal kinase. *Cancer Res.* 66, 445-52.
- Zhu, J. P., et al., 2006. Methamphetamine-induced cell death: selective vulnerability in neuronal subpopulations of the striatum in mice. *Neuroscience.* 140, 607-22.
- Zlokovic, B. V., 2005. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 28, 202-8.
- Zlokovic, B. V., 2008. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron.* 57, 178-201.
- Zozulya, A., et al., 2008. Pericyte-endothelial cell interaction increases MMP-9 secretion at the blood-brain barrier in vitro. *Brain Res.* 1189, 1-11.
- Zuo, J., et al., 1998. Neuronal matrix metalloproteinase-2 degrades and inactivates a neurite-inhibiting chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurosci.* 18, 5203-11.